

# **Talajszennyező mikroelemek felvételének, eloszlásának és speciációjának vizsgálata fonálférgekben mikroanalitikai módszerekkel**

Doktori értekezés

**Sávoly Zoltán**

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Kémia Doktori Iskola

Analitikai, kolloid- és környezetkémia, elektrokémia doktori program

Iskolavezető: Dr. Inzelt György, DSc

Programvezető: Dr. Záray Gyula, DSc

Környezetkémiai és Bioanalitikai Laboratórium

Témavezető: Dr. Záray Gyula, DSC, egyetemi tanár



Budapest, 2013

# Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. Talajszennyezés.....	6
2.1.1. Szervetlen talajszennyezők .....	8
2.1.1.1. A réz .....	11
2.1.1.2. A cink .....	12
2.1.1.3. A króm.....	14
2.1.1.4. Nanorészecskék .....	14
2.2. A fonálféreg.....	18
2.2.1. Talajlakó fonálféreg .....	19
2.2.1.1. Az európai tűfonálféreg.....	20
2.2.2. A fonálféreg mint bioindikátor.....	20
2.2.3. A fonálféreg mint modellszervezet.....	21
2.3. Műszeres módszerek .....	21
2.3.1. Totálreflexiós röntgenfluoreszcens spektrometria.....	21
2.3.1.1. A röntgenfluoreszcencia.....	21
2.3.1.2. A TXRF spektrometria elve .....	23
2.3.1.3. A TXRF spektrométer felépítése.....	26
2.3.1.4. A TXRF spektrometria gyakorlata, analitikai teljesítményjellemzői.....	27
2.3.1.5. A TXRF spektrometria biológiai alkalmazásai .....	29
2.3.2. Pásztázó elektronmikroszkópiai módszerek .....	30
2.3.2.1. Az elektronsugárzás kölcsönhatása az anyaggal .....	30
2.3.2.2. Elektronsugaras mikroanalízis .....	32
2.3.2.3. Fókuszált ionsugaras megmunkálás .....	32
2.3.2.4. Biológiai alkalmazások .....	33
2.3.3. XANES spektrometria.....	34
2.3.3.1. A szinkrotronsugárzás .....	34
2.3.3.2. A XANES spektrometria elve és gyakorlata.....	36
2.3.3.3. Biológiai alkalmazások .....	38
2.4. Szabadon élő fonálféreg mikroanalitikai vizsgálata.....	40
2.4.1. Elemtartalom meghatározása .....	40
2.4.2. Elemeloszlási vizsgálatok .....	41

2.4.3. Speciációs vizsgálatok.....	43
3. Célkitűzés .....	44
4. Kísérleti rész.....	46
4.1. Mintavétel és előzetes vizsgálatok .....	46
4.1.1. Mintavétel.....	46
4.1.2. A bértartalom eltávolíthatóságának vizsgálata .....	46
4.1.3. Az állatok biomasszájának vizsgálata .....	46
4.2. Az állatok kezelése .....	47
4.2.1. Nagyszemcsés és nano ZnO vizsgálata fizikai és kémiai módszerekkel .....	47
4.2.1.1. Kémiai összetétel vizsgálata EPMA módszerrel.....	48
4.2.1.2. Kristályszerkezet meghatározása XRD módszerrel .....	48
4.2.1.3. A részecskék mértetének és morfológiájának vizsgálata a szuszpenziókban .....	48
4.2.1.4. Nano ZnO-szuszpénzió részecskeméret-eloszlásának vizsgálata .....	48
4.2.1.5. Oldott cink mennyiségének meghatározása szuszpenziókból TXRF módszerrel.....	48
4.3. TXRF spektrometriai vizsgálatok .....	49
4.3.1. Módszerfejlesztés .....	49
4.3.1.1. A szerves mátrix eltávolíthatóságának vizsgálata .....	50
4.3.1.2. Összehasonlítás ICP-MS mérésekkel.....	50
4.3.2. Kezelt állatok TXRF spektrometriai vizsgálata .....	51
4.3.2.1. A minták tisztítása kezelés után .....	51
4.3.2.2. Élő állatok kezelése .....	51
4.3.2.3. Előzetesen elpusztított állatok kezelése .....	52
4.4. Elektronmikroszkópos vizsgálatok .....	52
4.4.1. Mintaelőkészítés.....	52
4.4.2. EPMA vizsgálatok.....	53
4.4.3. Metszetek készítése FIB technikával .....	53
4.4.4. Elemeloszlási vizsgálatok a keresztmetszetekben.....	54
4.4.5. Adatfeldolgozás.....	54
4.5. XANES vizsgálatok .....	54
4.5.1. Mérőhelyek.....	54
4.5.2. Mintaelőkészítés.....	55
4.5.3. Referenciavegyületek XANES vizsgálatokhoz.....	55
4.5.4. A mérések kivitelezése.....	58

4.5.5. Adatfeldolgozás.....	60
5. Kísérleti eredmények és értelmezésük .....	61
5.1. Előzetes vizsgálatok .....	61
5.1.1. Az állatok éheztetése .....	61
5.1.2. Az állatok tömegének meghatározása .....	62
5.1.3. Szén- és nitrogéntartalom.....	62
5.2. Nagyszemcsés és nano ZnO-szuszpenziók fizikai és kémiai jellemzése .....	63
5.2.1. Összetétel .....	63
5.2.2. A részecskék méretének és morfológiájának jellemzése .....	65
5.2.3. A ZnO vízzoldhatóságának vizsgálata .....	67
5.3. TXRF spektrometriai vizsgálatok .....	68
5.3.1. Módszerfejlesztés .....	68
5.3.1.1. Hideg oxigénplazmás roncsolás .....	68
5.3.1.2. Kezeletlen fonálférgek mikro- és nyomelemtartalma .....	69
5.3.2. Elemfelvételi vizsgálatok .....	70
5.3.2.1. A mosás hatásának vizsgálata .....	70
5.3.2.2. Rézfelvétel vizsgálata.....	73
5.3.2.3. Krómfelvétel vizsgálata.....	74
5.3.2.4. Cinkfelvétel vizsgálata .....	77
5.3.2.5. Elemfelvételi vizsgálatok előzetesen elpusztított állatokban .....	79
5.4. Elektronmikroszkópos vizsgálatok .....	82
5.4.1 Az alkalmazott mintaelőkészítési módszer vizsgálata .....	82
5.4.2. Rézfelvétel vizsgálata EPMA módszerrel.....	86
5.4.2.1. Elemeloszlási vizsgálatok a kutikulában .....	86
5.4.2.2. Elemeloszlási vizsgálatok a szájszuronyban, az ajakban és a fej környékén.....	87
5.4.3. Keresztmetszeti vizsgálatok .....	91
5.4.3.1. Keresztmetszetek létrehozása FIB technikával .....	91
5.4.3.2. Elemeloszlási vizsgálatok a keresztmetszetekben.....	93
5.5. XANES vizsgálatok .....	99
5.5.1. A réz kémiai környezetének vizsgálata .....	99
5.5.2. A cink kémiai környezetének vizsgálata .....	105
6. Összefoglalás.....	109
7. Summary .....	110

Rövidítések jegyzéke.....	111
Irodalomjegyzék.....	112
Köszönetnyilvánítás .....	134
Az értekezés témájában megjelent tudományos közlemények .....	135
Szóbeli előadások az értekezés témájában .....	135
Poszter az értekezés témájában .....	136
Egyéb szóbeli előadás .....	136

# 1. Bevezetés

Az utóbbi évtizedek egyre intenzívebb ipari termelésének, mezőgazdasági tevékenységének köszönhetően a talajszennyezés nagyon súlyos globális problémává vált. Egyrészt a talaj-ökoszisztéma súlyos károsodása következik be, hiszen a szennyező vegyületek bekerülnek a táplálékláncba, ezáltal negatív hatással vannak a talaj összes élőlényére. Másrészt a talajszennyezésnek komoly egészségügyi hatásai vannak, melyek felléphetnek szennyezett talajjal való érintkezés során, vagy illékony szennyezők belégzésekor is, nagyobb jelentősége van azonban a szennyezők talajvízbe vagy növényekbe történő bekerülésének.

A talajszennyezés vizsgálatára számos modern műszeres analitikai kémiai módszer áll rendelkezésre. Az egyes szennyezők koncentrációjának meghatározása azonban nem elegendő az általuk okozott kockázat vizsgálatára, hiszen a talajban mért és az élőlények által felvehető szennyezőanyag-mennyiség nem ekvivalens egymással, illetve egy adott szennyező elem hatása függhet attól is, hogy milyen kémiai formában van jelen, elég csak az esszenciális Cr(III)-ra és a karcinogén Cr(VI)-ra gondolnunk. Egy másik megközelítés esetén alkalmazhatunk ún. bioindikátorokat. Ezek olyan élőlények, melyek érzékenyen reagálnak bizonyos környezeti hatásokra, tehát egy adott élőlény-közösség összetételének változásának megfigyelésével a szennyezés milyensége és mértéke vizsgálható.

A fonálférgek megfelelnek a fenti kritériumnak, ezért alkalmazhatók bioindikációs vizsgálatokra, például talajszennyezés esetén. Egy másik tudományos felhasználása ezen állatoknak a modellszervezetként történő alkalmazás, biológiai és biokémiai folyamatok vizsgálatánál. A két alkalmazási terület akár át is hidalható, ha a szennyezésnek kitett állatokat egyedszinten vizsgáljuk tovább, és az egyes szennyezők élő szervezetre kifejtett hatását is elemezzük a szokásos vizsgálatok mellett. A talajlakó fonálférgek tipikusan a mikroszkopikus mérettartományba esnek, tehát ha ilyen élőlényeket szeretnénk analitikai kémiai módszerekkel vizsgálni, csak modern, nagyműszeres mikroanalitikai módszerek jöhetnek szóba. Bár ilyen berendezések rendelkezésre állnak, rutinszerű alkalmazásukat megakadályozza magas áruk, vagy például szinkrotronsugárzást alkalmazó módszerek esetén a viszonylag nehéz hozzáférhetőség is, ugyanakkor a komoly előnyök miatt az utóbbi években egyre elterjedtebbé váltak. Az irodalomban viszonylag kicsi azon közlemények száma, melyek mikroszkopikus méretű fonálférgekben található mikro- és nyomelemek koncentrációjának mérésével, illetve ezek térbeli eloszlásának és speciációjának vizsgálatával foglalkoznak.

## 2. Irodalmi áttekintés

A következőkben általános áttekintést adok a talajszennyezésről, részletesen szólok azon mikroelemekről (réz, króm, cink), melyek hatásának vizsgálatát végeztem doktori munkám során. Cink esetén elsősorban ZnO nanorészecskék hatását vizsgáltam, ezért röviden írok a nanorészecskékről, különös tekintettel azok toxikológiai vonatkozásaira. Adok egy általános áttekintést a fonálférgekről, majd bemutatom alkalmazási lehetőségeiket (bioindikáció, modellszervezetként történő felhasználás). Ismertetem röviden azokat a mikroanalitikai módszereket, melyek alapját képezték jelen dolgozatnak, az elvi áttekintés és technikai jellemzés mellett bemutatom alkalmazási lehetőségeiket biológiai minták vizsgálata esetén. Ismertetem továbbá biológiai minták minta-előkészítési módszereit elemeloszlási és speciációs vizsgálatok esetén, valamint áttekintem a fonálférgek mikroanalitikai vizsgálatával kapcsolatos szakirodalmat. Utóbbi esetben nem korlátozódok a munkám során használt technikákra, hanem az eddig az irodalomban közölt eredményeket kívánom összefoglalni.

### 2.1. Talajszennyezés

A talaj a földkéreg legkülső rétege, mely kémiai szempontból egy háromfázisú polidiszperz rendszer, mezőgazdasági szempontból növények termőhelye, megkülönböztető jele a termékenység. Vastagsága a centiméterestől a néhány méteresig terjed, nyílt rendszer, környezetével anyag- és energiaáramlásokkal kapcsolódik. A talaj önszabályozó rendszer [1]. A szilárd fázis egyrészt ásványi alkotókból, másrészt szerves anyagokból áll. A talajásványok lehetnek elsődlegesek, melyek a kőzetképződés folyamán keletkeztek, a talajban változatlan összetételben található meg, illetve másodlagosak, melyek az elsődlegesekből jönnek létre alacsony hőmérsékletű folyamatokban, vagy mállás révén. A talajban előforduló legjellemzőbb ásványok a következők: szilikátok, oxidok, hidroxidok, karbonátok, szulfátok, szulfidok, foszfátok, kloridok, nitrátok és borátok. Az élő szervezeteken túl a talajt alkotó szilárd szerves anyagok legnagyobb részt növényi eredetűek, kisebb részt állati maradványokból és anyagcseretermékekből származnak. Ebből kifolyólag a talajban minden olyan szerves vegyület megtalálható, mely az élőlényeket felépíti. Ezek közül legjelentősebbek a szénhidrátok (pl. cellulóz, keményítő); aminosavak, oligopeptidok és fehérjék; zsírok (trigliceridek, foszfolipidek) és a lignin, mely egy bonyolult felépítésű szerves vegyület, a növények sejtfalában rakódik le. A talajba bekerült szerves vegyületek bomlási folyamatokban vesznek részt, melynek során először további szerves vegyületek keletkeznek, a folyamat végén ezek részben szervetlen (szén-dioxid, nitrogén-, kén- és foszforvegyületek),

részen bonyolultabb szerves vegyületekké (humuszanyagok) alakulnak, vagy élő szervezetekbe épülnek be. A talaj folyadékfázisát talajoldatnak nevezzük, ebben a sók disszociált állapotban fordulnak elő. Leggyakoribb szervetlen összetevői:  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{CO}_3^{2-}$ -,  $\text{NO}_3^{2-}$  és  $\text{PO}_4^{3-}$ -ionok. Szerves összetevői főként egyszerű szerves savak és humuszanyagok (huminsavak). A gázfázis neve talajlevegő, bár összetétele eltér a légköritől, a nitrogéntartalma majdnem azonos (néhány tized százalékkal nagyobb, a denitrifikációs folyamatoknak köszönhetően), de az oxigéntartalma kisebb néhány százalékkal, és százalékos nagyságrendben található benne szén-dioxid is. Ezen eltérés fő oka, hogy a talajban nem zajlik fotoszintézis [2].

A talajok károsodása olyan folyamat, mely során azok eredeti tulajdonságai negatív irányban megváltoznak. Ezen folyamatok lehetnek természetesek (pl. víz- vagy szélrózsió), vagy okozhatják emberi folyamatok (pl. elmocsarasodás vagy kiszáradás a bányászatnak köszönhetően, talajszennyezés). Talajszennyezés során valamilyen xenobiotikum (élő szervezetek számára idegen anyag) jut be a talajba, ennek következtében az ökológiai talajfunkciók károsodnak. A talajszennyezők lehetnek szerves vegyületek (például poliaromás szénhidrogének [3], benzol [4], fenolok [5], olajok [6], peszticidek [7], herbicidek [8]), illetve szervetlen anyagok, ezekről a következő fejezetben részletesebben szölok. A talajszennyezők különböző módokon fejthetik ki káros hatásaikat. A növényi felvétel negatív hatással van az érzékeny növényekre, valamint a szennyezők bekerülnek a táplálékláncba, ezáltal felvehetővé válnak az ökoszisztéma többi élőlénye, vagy mezőgazdasági talaj esetén az ember számára. A haszonállatok lenyelhetik a szennyezett talajt, ez káros egészségügyi hatást fejt ki rájuk, illetve újabb szennyező forrásként szolgálhat az ember számára. A szennyezett talaj részecskéi bejuthatnak a levegőbe, vagy illékony szennyezőanyagok közvetlenül is bekerülhetnek párolgással. Ez szintén szennyező forrás az ember számára. A legkomolyabb veszélyforrást azonban a talajszennyezők vízbe való bekerülése jelenti, ez történhet kimosódással, ekkor a talajvizekbe és felszíni vizekbe is bekerülhetnek, utóbbiak szennyeződhetnek talajerózió következtében is [9]. A talajszennyezés csökkenti a talajok termékenységét, a táplálékláncba való bekerülésének köszönhetően káros hatása van a talaj-ökoszisztémára, az utóbbi hatás miatt is és részben közvetlenül is negatív hatása van az ember egészségére is. Itt kell megemlíteni a bioakkumuláció vagy biokoncentráció és biomagnifikáció nevű jelenségeket. Előbbi azt jelenti, hogy egy élőlényben a szennyező mennyisége nagyobb koncentrációban van jelen, mint az adott környezeti elemében, ahonnan a felvétel történt. A biomagnifikáció pedig azt jelenti, hogy a tápláléklánc magasabb szintjén



lévő egyedben nagyobb a szennyezőanyag koncentrációja. Ezen hatás miatt a ragadózok és az ember a legkitettebb a talajszennyezésnek.

### 2.1.1. Szervetlen talajszennyezők

A szervetlen talajszennyezők között találhatók anionos formában jelenlévők (pl.:  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{SeO}_4^{2-}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ ), illetve fémes elemek (nikkel, ólom, kadmium, króm, kobalt, vas, mangán, cink, alumínium, réz). Utóbbiakat – az alumínium kivételével – gyakran hívják nehézfémeknek az irodalomban, sok közleményben együtt tárgyalják őket az arzénnal és a szelénnel, értekezésemben talajszennyező mikroelemként fogok utalni rájuk. Toxikus elemek nem szennyezett talajban is előfordulhatnak, a talajképző kőzetből származnak [10]. Antropogén forrás sokféle van, célszerű azokat különböző emberi tevékenységek szerint csoportosítani. A 2.1. táblázat áttekintést ad különböző eredetű szennyezett talajok elemanalitikai vizsgálatairól, az elmúlt néhány évből. A talajszennyező elemek sorsa a talajban nagyban függ attól, hogy mi az adott elem, sőt annak kémiai formájától is. Általánosságban elmondható, hogy egy kezdeti gyors adszorpció következik be, mely időtartama a perc-óra nagyságrendbe esik, ezt követik lassabb adszorpciós reakciók, melyek hónapokig, évekig tartanak, ezek során az adott elem kémiai formája is megváltozik (redisztribúció) [28]. Fémionok fontosabb kötési formái a talajban a következők: szabad hidratált ion; ionasszociátumok, szervetlen komplexek és diszpergált kolloidok a folyadék fázisban, valamint csapadékok; kicserélhető és specifikusan adszorbeált ionok kolloidokon és szilikátok rácsalkotó ionjai a szilárd fázisban. A fontosabb reakciók pedig a következők: Ioncsere reakciók; szerves fémkomplexek képződése; specifikus kationadszorpció; csapadékképződés; redoxi reakciók [10]. A következőkben rövid jellemzést adok a doktori munkám során vizsgált három mikroelemről, elsősorban talajtani szempontból, valamint rövid általános ismertetést adok a nanorészecskékről, különös tekintettel toxikológiai vonatkozásaikra.

Talajszennyezés eredete	Vizsgált elemek vegyjele	Analitikai módszer	Vizsgálat helye	Megjegyzés	Hivatkozás
Közlekedés	Pb, Zn, <u>Cd</u> , Cu, Ni, Mn, Cr, Fe	FAAS, <u>GFAAS</u>	Corlu és Cerkezkoj közti főút mentén, Törökország	Búzanövényt is elemeztek, a talaj komoly ólomszennyezését mutatták ki.	[11]
	Cu, Zn, Cd, Pb	ICP-MS	Trishuli City és Katmandu közti főút mentén, Nepál		[12]
	Cd, Cr, Zn, Mn, Fe, Cu, Ni, Pb	AAS	Oyo és Ilorin közti út mentén, Ogbomosoba, Nigéria		[13]
	Pb, Zn, Cu, Ni, Cd	ICP-MS	Ljubljana-Obrezje közötti főút mentén, Szlovénia	Ásványtani vizsgálatot is végeztek por XRD- val.	[14]
Bányászat	Cu, Cd, Ni, Pb, Zn, <u>Hg</u> , <u>Cr</u> , <u>Co</u>	ICP-OES <u>INAA</u>	Ibériai Pirit Öv, Spanyolország	XRD és EPMA vizsgálatokat is végeztek	[15]
	Fe, Mn, Al, Zn, Cu, Pb, Cd, Cr, Ni, <u>As</u>	ICP-OES <u>XRF</u>	Madrid és Toledo, Spanyolország	Zabot is elemeztek, bioakkumulációt figyeltek meg.	[16]
	Al, Si, K, Ti, Fe, Cu, Rb, Rh, Pb, As	XRF	Hawwal és Bagega, Nigéria		[17]
	Cu	AAS	Khetri, India	Több növény réztartalmát is vizsgálták, dúsulást tapasztaltak.	[18]

2.1. táblázat: Szennyezett talajok elemanalitikai vizsgálata

Talajszennyezés eredete	Vizsgált elemek vegyjele	Analitikai módszer	Vizsgálat helye	Megjegyzés	Hivatkozás
Hadászat	Cu, Cr, Mn, Ni, Zn, Pb	AAS	Gaiziunai, Kairiai, Litvánia	Az elemek mélységi eloszlását is vizsgálták.	[19]
	Na-Cl, K, Ca, Ti-Br, Rb- Mo, Ag-I, Cs, Ba-Nd, Sm, Hf, Ta, W, Hg, Tl, Pb, Bi, Th, U	XRF	Luzern közelében, Svájc	Növényeket is vizsgáltak.	[20]
Mezőgazdaság	Cu, Pb, Zn, Cd, Fe	FAAS	Cross River State, Nigéria	Rézszenyezést vizsgáltak, a többi elemet az összehasonlítás miatt mérték.	[21]
	Sn, Cu, Fe, Zn	AAS	Abakaliki, Nigéria	Mezőgazdasági célú szennyvíziszap- felhasználás hatását vizsgálták.	[22]
Ipar	Pb, Cu, Ni, Zn	FAAS	Suleja (kerámiagyár) és Minna (gyógyszergyár), Nigéria		[23]
	Fe, Cu, Cr, Zn, Ni	AAS	Mysore, India		[24]
	As, Cr, Cu, Ni, Pb, V, Zn	XRF	Vas- és acélgyár közelében, Galati, Románia		[25]
	Pb, Cu, Zn, Co, Ni, Cr	AAS	Islamabad ipari övezete közelében, Pakisztán	Növényeket is vizsgáltak	[26]
	Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Hg	ICP-MS, Hg analizátor (CVAAS)	Lodz és Gdansk környéke, Lengyelország	Foszfogipszet is elemeztek, a közlekedés hatását is vizsgálták.	[27]

2.1. táblázat (folytatás)

#### 2.1.1.1. A réz

A réz a periódusos rendszer d-mezőjének és 11-es csoportjának legkisebb rendszámú eleme. Moláris tömege 63,546 g/mol, sűrűsége 8,96 g/cm<sup>3</sup>, a 26. leggyakoribb elem a földkéregben, de a felhasználás tekintetében a harmadik leggyakoribb fém a vas és az alumínium után. Az ezüst után a második legjobb elektromos vezető, előbbi magas ára miatt azonban a rezet elterjedten alkalmazzák elektromos vezetékek gyártására, legfontosabb ötvözetek a sárgarézt (cinkkel ötvözve) és a bronz (ónnal ötvözve ónbronzt, további fémeket is tartalmazhat). Vívezetékekben is alkalmazzák, ezért az ivóvíz rezet tartalmaz, bár ez nem járul hozzá jelentősen az emberi rézfelvételhez. Közlekedési eredetű szennyezőként is jelentős a réz, a fékbetétek kopásának következtében kerül a légköri aeroszolba. Mezőgazdasági alkalmazása széleskörű, növényi tápanyagként, baktericidként, fungicidként és algicidként is felhasználják, gyakran alkalmazott peszticidek: CuSO<sub>4</sub> és Ca(OH)<sub>2</sub> keveréke (bordói ló), CuSO<sub>4</sub>·3Cu(OH)<sub>2</sub>, Cu<sub>2</sub>O, Cu(OH)<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>·3Cu(OH)<sub>2</sub>. A réz nagy része a talaj felső rétegeiben akkumulálódik [29], ahol a talaj szerves anyagához és vas-oxidokhoz kötődik, utóbbi esetben az agyagfrakcióban [30]. A hagyományos művelt szőlőskertek talajának felszíni rétegeiben számos kutatócsoport mutatott ki nagyobb réztartalmat a szennyezetlen talaj átlagos rézkoncentrációjához képest [31-33], Brazíliában egy kutatócsoport extrém magas rézkoncentrációt mért (3200 mg/kg, [34]). A réz előbb említett talajbeli speciációja miatt a kationosan jelen lévő réz mennyisége viszonylag kicsi, a pH csökkenésével növekszik. Martinez és Motto egyes elemek oldhatóságát vizsgálták talajban, meghatározták azt a pH-t, amelyen az ionosan jelenlévő mennyiség eltér a természetes talajokban mérttől, rézre ez az érték 5,5 [35].

A réz esszenciális elem az élő szervezetek számára, számos létfontosságú enzim kofaktora, a fontosabbakról a 2.2. táblázat ad áttekintést. A rézhiány nagyon ritka, főleg genetikai rendellenesség esetén fordul elő (Menkes-kór). A Wilson-kór szintén genetikai betegség, a cöruoplazmin hiánya okozza, melynek következtében rézfelhalmozódás történik a szövetekben, ugyanakkor a vérérum réztartalma csökken [40]. A rézhiány okozhat vérszegénységet, csonttritkulást, koordinációs zavart, klinikai tünetei: színtelen, göndör haj, petyhüdt bőr, járászavar, görcsök, valamint a vérszegénység tünetei (fáradékonyság, gyengeségérzés, szapora szívverés, bőrelváltozások: sápadtság, töredezett körmök, hajhullás). Emberi szervezet esetén a rézmérgezés során legérzékenyebben reagáló belső szerv a máj, állatoknál a felszívódásáért és kiválasztásáért felelős szervek (máj, vesék), további célszervek: csont, központi idegrendszer, immunrendszer. A véletlenül vagy baleset miatt elfogyasztott nagy mennyiségű réz esetén a következő tüneteket figyelték meg: hasfájás, fejfájás,

hányinger, szédülés, hányás és hasmenés, szapora szívverés, légzési nehézség, vérszegénység, véres vizelet, gasztrointesztinális vérzés, máj- és vese-rendellenesség és halál. Krónikus kitétség esetén máj-rendellenesség, bőrön keresztüli felvétel esetén előfordulhatnak allergiás tünetek [41].

Enzim	Funkció
Citokróm-c oxidáz [36]	Elektrontranszport a mitokondriumban
Réz/cink szuperoxid-dizmutáz [37]	Szuperoxid átalakítása peroxiddá (antioxidáns)
Metallotionein [38]	Réztöbblet tárolása
Cöruoplazmin [39]	Réztranszport, Fe(II) oxidálása Fe(III)-má, vas mobilizálása

## 2.2. táblázat: Fontosabb réztartalmú enzimek

### 2.1.1.2. A cink

A cink a periódusos rendszerben a réz mellett található, rendszáma eggyel nagyobb. Moláris tömege 65,38 g/mol, sűrűsége 7,14 g/cm<sup>3</sup>. A földkéregbeli gyakoriságát tekintve a réz előtt, ipari felhasználásának mértékét tekintve mögötte található egy hellyel (25. illetve 4.). Egyik fő felhasználási területe a korrózióvédelem. Galvanikus fémbevonatot készítve védi a bevont fémeket az oxidációtól, a cinkkel bevont vasat például horganyzottnak nevezik a köznyelvben, elterjedten használják esőcsatornák, vödrök gyártására. Katódos fémvédelem során anódként kapcsolják a védendő fémhez, erre olyan esetekben van szükség, amikor a bevonás nem megoldható, például földalatti csővezetékeknél. Felhasználják galvánelemekben is anódként. A cink fontos komponense több fémötvözetnek, pl. sárgarézt (rézzel ötvözve), alumíniummal is gyakran ötvözik, bronz is tartalmazhat kisebb mennyiségben cinket a réz és ón mellett. Vegyületeinek felhasználása is széleskörű, megtalálhatók például festékekben, kenőcsökben, gumiban. A cink is jelentős közlekedési eredetű szennyező, a fékbrutók kopása mellett ebben az esetben a gumibroncsok szerepe is jelentős. Fontos mikrotápanyaga a talajnak, előnyös hatással van mind az állatokra, mind a növényekre [42], de egy adott határérték feletti mennyiségben toxikus. Hozzáférhetőségét erősen befolyásolják a talaj bizonyos paraméterei [43]: a pH növelésével csökken [44], a szervesanyag- [45] és agyagtartalmat növelve növekszik [46]. A talajban lakó mikroorganizmusok

élettevékenységét és ezáltal a szerves anyag lebontását negatívan befolyásolja [47]. Ugyanakkor vannak olyan talajok, ahol a cinkhiány jelent komoly problémát [48].

A cink minden élőlény számára létfontosságú elem, 200-nál több cinktartalmú fehérjét ismerünk [49], a legfontosabbakat – a réznél már említett szuperoxid-dizmutáz és metallotionein mellett – a 2.3. táblázat tartalmazza. Ezek mellett fontos még megemlíteni az ún. cink-ujj motívumot, mely több fehérjében megtalálható, fontos szerepet játszik például a génátírásban [54]. Enyhe cinkhiányt okozhat a nem megfelelő cinkbevitel, tünetei a csökkent ízérzékelés, lecsökkent spermaszám és szérum tesztoszteronszint, valamint fogyás. Közepes mértékű hiányt okozhatnak az előbbi mellett bizonyos betegségek (pl.: krónikus májbetegség, felszívódási zavarok), ennek következtében a következő problémák léphetnek fel: növekedési rendellenességek, késés a nemi érésben, bőrproblémák, anorexia, aluszékonyság, lassú sebgyógyulás. Súlyos cinkhiányt okozhat az acrodermatitis enteropathica nevű betegség, hosszú ideig tartó nagykalóriás infúziós kezelés, vagy penicillamin terápia, ekkor dermatitisz, hasmenés, kopaszodás, mentális problémák és az immunrendszer gyengesége miatt visszatérő fertőzőes megbetegedések léphetnek fel [55]. A cink kevésbé toxikus elem, de nagy mennyiségben történő bevitele egészségügyi problémákat okoz (hányinger, hányás, gyomorfájás, letargia, fáradtság). Kisebb mértékű túladagolás (100-300 mg/nap, az ajánlott érték 15 mg /nap) esetén is megfigyelhetők a rézhiány tünetei (ld. előző fejezet). Ennek az az oka, hogy a cink a metallotionein keletkezését nagymértékben indukálja, ugyanakkor a réz metallotioneinhez való affinitása nagyobb, mint a cinké [56].

Enzim	Funkció
Szénsav-anhidráz [50]	Szén-dioxid hidratációja
Karboxipeptidáz [51]	Aminosavak lehasítása a fehérjék C-terminális végén
Lúgos foszfatáz [52]	Foszfát-észter hidrolízis
Alkohol-dehidrogenáz [53]	Alkoholok oxidációja

2.3. táblázat: Fontosabb cinktartalmú enzimek

### 2.1.1.3. A króm

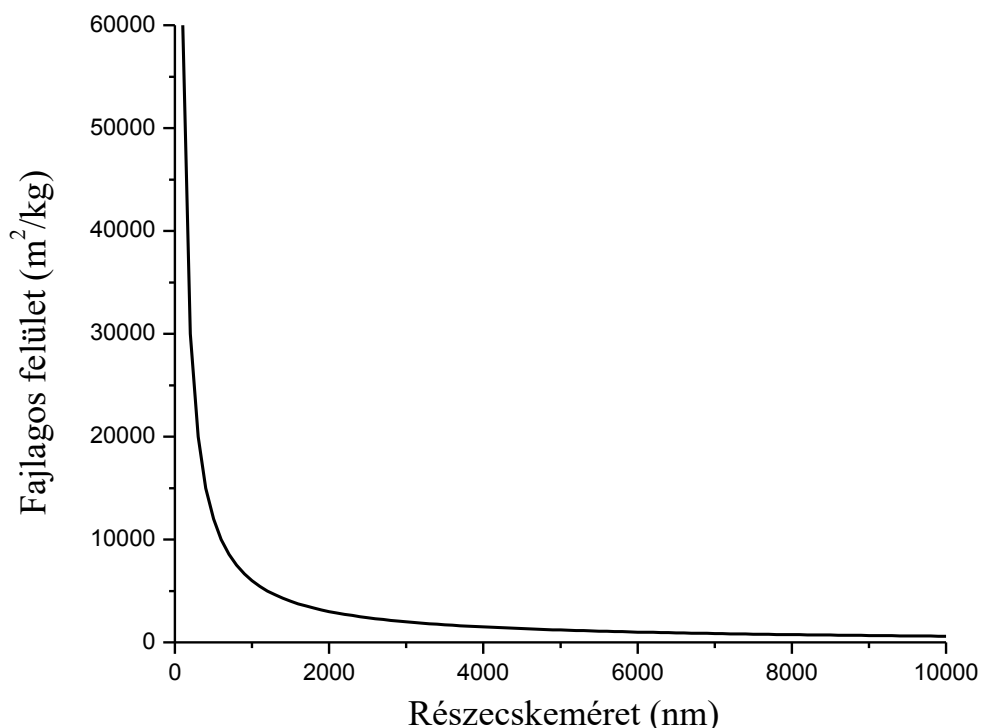
A króm a periódusos rendszerben a d-mező első periódusában és a hatodik csoportban található. Moláris tömege 51,9961 g/mol, sűrűsége 7,15 g/cm<sup>3</sup>. A földkéreg 21. leggyakoribb eleme. Levegőn passzíválódik, ezért előszeretettel alkalmazzák ötvözetekben, például a rozsdamentes acél is tartalmaz krómot, továbbá fémbevonatokat is gyakran készítenek belőle. Vegyületeit széles körben használják, például bőrcserzésre, fakonzerválásra, pigment és festékgyártásra. Fő szennyezőforrásai a galvanizálási folyamatok és a krómtartalmú hulladékok. A krómnak – az elemi állapoton túl – két stabil oxidációs állapotú formája van: Cr(III) és Cr(VI). Utóbbi a domináns forma sekély víztározókban, aerob körülmények között. A talaj szerves anyagai, S<sup>2-</sup> és Fe<sup>2+</sup> hatására redukálódhat Cr(III)-má. A Cr(VI) fő specieszei (CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup> és Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>) csapadékot képezhetnek a talaj kationjaival, illetve adszorbeálódhatnak is. A Cr<sup>3+</sup> a stabil forma 4-nél kisebb pH-értéknél, jellemző reakciója a talajban a komplexképzés [28].

A króm esszenciális volta sokáig ismeretlen volt, mert olyan kis koncentrációban van jelen biológiai mintákban, hogy megbízható detektálására az 1980-as évekig kellett várni [57]. A kromodulin nevű, kis molekulatömegű, krómot tartalmazó oligopeptidet is ebben az időszakban izolálták [58]. Szerepe van az inzulin receptor tirozin-kináz aktivitásának stimulálásában, ezáltal az anyagcsere-folyamatok szabályozásában [59]. Bár a Cr(III)-at általában nem tekintik toxikusnak – csekély felszívódása miatt [60] – a táplálékkiegészítőként leggyakrabban alkalmazott króm-pikolinát esetén a DNS molekula hasadását figyelték meg [61]. A Cr(VI) nagyon toxikus, a halálos dózis (orális felvétel esetén) 50-70 mg vízoldható kromát testsúlykilogrammonként [60]. Az akut mérgezés tünetei a következők: hányás, hasmenés, béltraktus vérzése, kardiovaszkuláris sokk, legfontosabb krónikus tünetek a máj- és vesenekrózis. A Cr(VI) toxikus hatása mellett allergén [62], karcinogén hatása pedig már több mint 100 éve ismert [63]. Utóbbi hatásmechanizmusa még ma sem tisztázott teljesen, három fő elképzelés létezik: a Cr(VI) redukciója során keletkező hidroxil- és más reaktív gyökök; Cr(V) és Cr(IV); Cr(III) okozza a DNS károsodását [64].

### 2.1.1.4. Nanorészecskék

Nanorészecskék alatt olyan anyagokat értünk, melyek mérete 100 nm alatti, a IUPAC definíciója szerint minden dimenzióban 1 és 100 nm között, illetve idesorolja a nanocsöveket és nanoszálakat, melyek csak két dimenzióban felelnek meg ennek a követelménynek [65]. Számos közleményben, úgy definiálják a nanorészecskéket, hogy legalább egy dimenziójukban megfelelnek a fent említett követelménynek [66-68]. A részecskék fajlagos

felülete (egységnyi tömegre jutó felület) fordított arányban áll a részecskemérettel, az említett tartományban drasztikus növekedés tapasztalható (2.1. ábra).



2.1. ábra: A fajlagos felület függése a részecskemérettől (átmérőtől),  $1000 \text{ kg/m}^3$  sűrűségű anyagot, azonos méretű gömb alakú részecskéket feltételezve

Hasonló függést mutat a felszínen lévő részecskék aránya az összes részecske számához viszonyítva. A nanorészecskéket a nagyobb mérettartományba eső, de azonos kémiai összetételű anyagokkal összehasonlítva eltérések tapasztalhatók a fizikai-kémiai tulajdonságokban, pl.: vezetőképesség, reaktivitás, mechanikai, optikai, termikus tulajdonságok [69-71]. Eredetük alapján három csoportra oszthatjuk őket: természetes, véletlenül előállított és tervezett nanorészecskéket. Az első kategóriába tartozik például a vulkáni hamu, de akár a kórokozók is sorolhatók ide, a másodikba az emberi tevékenység (pl.: közlekedés, ipari tevékenység) által kibocsátott nanorészecskék, a harmadikba tartozókat általában külön tárgyalják. Ezek további négy alkategóriába sorolhatók: 1.: szénalapú anyagok (fullerének, szén nanocsövek); 2.: fémalapú anyagok (kvantumpöttyök, nanoarany, nanocink, nanoalumínium, nanoméretű  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ); 3.: dendrimerek, melyek



nanoméretű polimerek; 4.: kompozitok, melyek többfajta nanorészecskének, vagy nanorészecskének és nagyszemcsés anyagnak a keveréke. Az első kettőbe tartozók a legelterjedtebbek és leginkább tanulmányozottak [72]. Előnyös tulajdonságaiknak köszönhetően a nanorészecskéket egyre növekvő mértékben alkalmazzák, számos felhasználási területük van: elektronika, gyógyászat, kozmetika, energetika, katalizátorkutatás, környezeti alkalmazások [73]. A nanorészecskék aggregációra hajlamosak, ennek során több részecske összetapadásával nagyobb egységek, aggregátumok képződnek. Ennek megakadályozása érdekében gyakran bevonatot alkalmaznak.

A nanorészecskék tudományának ellenzői és támogatói között megegyezés van abban, hogy környezeti és egészségügyi kockázatot jelenthetnek, ezért élő szervezetekre és környezetre kifejtett hatásuk vizsgálata elengedhetetlen. Bár pontos adatok még nem állnak rendelkezésre a környezet nanorészecske-terhelését illetően, potenciális szennyezői a levegőnek, a vizeknek és a talajkörnyezetnek is [67]. A nanorészecskék toxicitását számos tényező befolyásolhatja a méretükön túl, például alakjuk, a részecskék aggregációja, a stabilizáláshoz használt bevonat. A manapság legfejlettebb elmélet, mely megmagyarázza a nano méretű anyag fokozott toxicitását az azonos összetételű nagyszemcsés anyaghoz képest a reaktív oxigén specieszek (ROS) keletkezésének elmélete. Ahogy csökken a részecskék mérete, egyrészt egyre több molekula jut a felszínre, ahogy korábban említettem, másrészt nem folytonos kristálysíkok keletkeznek, ez növeli a szerkezeti hibák számát és megváltoztatja az anyag elektronkonfigurációját, megváltoztatva ezzel annak tulajdonságait is. Ezáltal specifikus felszíni csoportok jönnek létre, melyek különböző tulajdonságúak lehetnek az adott anyag függvényében (pl. hidrofób, hidrofil). Ezeken az aktív helyeken különböző kémiai reakciók játszódhatnak le, pl. a molekuláris oxigén befoghat egy elektron, ezáltal szuperoxid gyök keletkezik ( $O_2^-$ ), ebből további reakciókkal (pl.: Fenton-reakció [74]) újabb ROS-ek keletkezhetnek [75]. Bár a ROS-eknek fontos biológiai feladataik vannak (pl.: szabályozó funkciók) és a szervezetünkben mennyiségüket szabályozó mechanizmusok is működnek, a külső hatásoknak köszönhetően (pl. nanorészecskék expozíciója) károsíthatják az emberi szervezetet, pl. a DNS mutációjával vagy fehérjék oxidációjával, megnövelve a rák és más genetikai megbetegedések kockázatát [76,77]. A toxicitást befolyásolja a nanorészecske kémiai összetétele is. Derfus és munkatársai azt találták, hogy CdSe kvantumpöttyök csak abban az esetben toxikusak, ha felszabadulhat belőlük a közismerten toxikus kadmium vagy szelén, ha ezt megakadályozzuk különböző bevonatokkal, toxikus hatás nem tapasztalható [78]. Brunner és munkatársai oldhatatlan ( $CeO_2$ ,  $TiO_2$ ,  $ZrO_2$ ) és kissé oldódó ( $Ca_3(PO_4)_2$ ,  $Fe_2O_3$  és  $ZnO$ ) fémoxid nanorészecskék citotoxikus hatását vizsgálták.

Megállapították, hogy az oldhatatlanoknak is van toxikus hatása, de a másik csoportba tartozóké erőteljesebb, a  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -nál olyan mértékű toxicitást találtak, mely nem magyarázható pusztán az oldhatósággal [79].

Az előbbieken említettem, hogy pontos mérési adatok nem állnak rendelkezésre a környezetbe juttatott mesterséges nanorészecskék koncentrációját illetően, csak modellszámítások léteznek. Ezek alapján a talaj nanorészecske-koncentrációja nagyobb, mint a vízé vagy a levegőé [80]. A nanorészecskék talajba jutása történhet a szokásos módokon (előállítás, szállítás közbeni kikerülés; hulladék-kihelyezés; szennyvízzel történő kijutás), de használják őket talajremediációra is [81], fotokatalitikus aktivitásukat kihasználva szerves szennyezők eltávolítására, adszorbensként fémek, arzén és szerves vegyületek megkötésére, vagy redoxi reakciókban, pl.: Cr(VI) redukciójára. A nanorészecskék sorsát a talajban befolyásoló folyamatok közül a következők a legjelentősebbek: oldódás; szorpció, aggregáció; bioakkumuláció növényekben; felhalmozódás és toxicitás gerinctelen állatokban; mikrobiológiai toxicitás; közvetlen részecske felvétel, toxicitás; részecske migráció [82]. Bár a nanorészecskék környezetre és élő szervezetekre kifejtett hatásának vizsgálata még gyerekcipőben jár, számos tanulmány jelent meg az utóbbi években, melyek egyes nanorészecskék talajban való viselkedését [83-85], vagy egyes talajlakó élőlényekre kifejtett hatását [86-91] vizsgálták.

A nano ZnO az egyik legelterjedtebben alkalmazott nanorészecske napjainkban, megtalálható fogkrémekben, festékekben, műanyagokban. A nagyszemcsés formához képest nagyobb mértékű UV abszorpciója miatt [92] alkalmazzák naptejekben. Vizes élőhelyeken az egyik legkártékonyabb nanorészecskének bizonyult [93], ebben az esetben a toxicitás főként az oldott cinknek és nem a nanorészecske-természetnek volt köszönhető [94,95]. Gottschalk modellszámításai szerint a talaj nano ZnO terhelésének fő forrása a szennyvíziszap [80]. A talaj élőlényeinek vizsgálatával kapcsolatos eredmények alapján eltérőek a vélemények a nano ZnO toxicitását és annak okait (nanorészecske-jelleg vagy oldódás) illetően. Kool és munkatársai ugróvillásokat vizsgáltak, és a toxicitásért elsősorban a  $\text{Zn}^{2+}$  ionok jelenlétét tették felelőssé [86], míg Wang és munkatársai mindkét hatást megfigyelték *Caenorhabditis elegans*-sal (*C. elegans*) végzett vizsgálataik során [88]. Hooper kutatócsoportja gyűrűsférgeket vizsgált,  $\text{ZnCl}_2$  esetén erősebb toxikus hatást mutattak ki, mint nano ZnO-dal történő kezelés során, utóbbi esetben az állat szöveteiben ZnO nanorészecskéket mutattak ki pásztázó elektronmikroszkópia (SEM) segítségével [89]. Zhao és munkatársai gabonanövényekben tanulmányozták a nano ZnO felvételét, a gyökerek és hajtások cinktartalmát vizsgálták ICP-OES módszerek segítségével, és mindkét helyen növekedést

tapasztaltak a kezelési koncentráció növelése esetén [96]. Ezzel szemben Lin és Xing perje esetén a ZnO nanorészecskék gyökérfelszínhez való nagymértékű kötődését tapasztalták, a hajtásban azonban csekély mennyiségben volt cink jelen [97].

## 2.2. A fonálférgék

A Földön minden öt többsejtű élőlényből négy a fonálférgék (latinul *Nematoda*) törzsébe tartozik [98]. Eddig több mint 25.000 fajukat írták le [99], de a tényleges fajszaám 100.000 és 1.000.000 közötti lehet [100]. Élőhelyüket tekintve meglehetősen változatosak, az ún. szabadon élők megtalálhatók édes- és tengervízben, valamint a talajban. Ezenkívül több ezer parazitafajt tartanak számon. Méretüket tekintve is nagy változatosság jellemző rájuk, a szabadon élő fonálférgék többnyire mikroszkopikusak (mm-es hosszúság, néhány 10 µm-es szélesség), a paraziták között azonban vannak több méter hosszúak is. Az eddig leírt leghosszabb fonálféreg a nagy ámbraáscet méhlepényében megtalálható *Placentonema gigantissima*, a nőstény 6,75-8,4 m hosszúságú lehet, a testátmérő azonban ebben az esetben is csak 1,5-2,5 cm [101]. A fonálférgék nevüket jellegzetes alakjukról kapták, a fent említett méretviszonyok alapján nyilvánvaló, hogy a hosszuk sokszorosa a szélességüknek. Az ún. nem valódi testüreges (pseudocoelomata) állatok közé tartoznak. Testük henger, keresztmetszetben kör alakú. Fejük sugaras, a test többi része kétoldali szimmetriájú. A fejen érzékelő sörték találhatók, a szájnyílást három vagy hat ajak veszi körül. A szájszervben eltérések mutatkoznak, attól függően, hogy az állat mely táplálkozási csoporthoz tartozik.

Kültakarójuk három rétegből áll (kívülről befelé haladva): kutikula; epidermisz, mely lehet sejtes szerkezetű, vagy sejthatárok nélküli; izomréteg, melynek rostjai egy-egy sejtből állnak [102]. A kutikula a fonálférgék külső váza, jól strukturált extracelluláris mátrix. Több feladata van, biztosítja a határt az állat és környezete közt, nagy ellenállóképességének köszönhetően védelmet nyújt, fontos szerepe van az állat helyváltoztató mozgásában is, a testfal izmaival való kapcsolata következtében. Lehetővé teszi az állat növekedését is a vedlésnek köszönhetően. A kutikula anyaga az epidermisz apikális membránjából választódik ki, majd annak felszínén polimerizálódik [103]. A fonálférgék kutikulájának fő összetevője a kollagén, egy gyakori szerkezeti fehérje, alapegysége a Gly-X-Y tripeptid, ahol X és Y gyakran prolin, vagy hidroxiprolin, ezenkívül cisztein oldalláncokat tartalmaz [104]. A kutikula tartalmaz további fehérjéket, ún. kutiklineket [105], ezek nagyon stabil vegyületek, ellenállnak a kutikula ionos detergenssel és redukálószerrel történő extrakciójának is. A kutiklinek sok keresztkötést tartalmaznak és ciszteinben gazdag zónával rendelkeznek. A kutikula felszíni

rétege, az epikutikula lipidekben gazdag, erre egy glikoproteinekben gazdag, negatívan töltött felszíni réteg választódik ki [106].

A szájüreg az izmos garatban folytatódik, mindkettőt kutikula béleli. A bélcsatornában nincsenek izmok, a táplálék mozgása az állat mozgásának következtében valósul meg. Az emésztőrendszer utolsó szakasza a végbél, mely kutikulával bélelt végbélnyílásban végződik, ez az állat farki végének közelében található. Nincs sem különálló légző- sem keringési rendszerük. A légzés a kültakarón keresztül zajlik, ún. diffúz légzés. A tápanyagok és anyagcseretermékek a testüregben gyűlnek fel, ezek szabályozását a test két oldalán található kiválasztó csatornák végzik. Az állatok teste mentén négy idegdúc fut végig (dorzális, ventrális és két laterális). Az állatvilág többi képviselőjétől eltérően a fonálférgeknél az izomsejtek nyúlványai létesítenek kapcsolatot az idegrendszerrel. Az idegrendszer központja a garat közelében található idegyűrű. A fonálférgek nagy többségénél hím és nőstény állatok is vannak és ivaroson szaporodnak. Mindkét nemnek csöves ivarszervei vannak. A hímek egy vagy két pár herével rendelkeznek. A nőstényeknél két petefészek a jellemző, melyek petevezetékben és méhben folytatódnak, ezekből is általában kettő van. A méhek a vulvanyíláson keresztül vannak kapcsolatban a külvilággal, ez általában a nőstény testének közepe táján található. A szabadon élő fonálférgeknél hat fejlődési stádiumot különböztetünk meg: pete, négy lárva, felnőtt állat [102].

### **2.2.1. Talajlakó fonálférgek**

Egy maréknyi talaj több ezer fonálférget tartalmazhat [107]. Kulcsszereplői a talaj táplálékhálózatainak, szabályozzák más szervezetek létszámviszonyait. Részt vesznek a növényi tápanyagok mineralizációjában [108-111]. Bár néhány növényevő faj a gyökerek belsejében él, a legtöbb talajlakó fonálféreg a talajrészecskéket körülvevő nedves filmben. A gyökerek közelében található, ún. rizoszféra talajban található meg a legnagyobb mennyiségben. Táplálkozási módjukat tekintve a következő három típusú fonálféreg a legelterjedtebb (a gyakoriság szerinti csökkenő sorrendben): növényevő, baktériumevő, gombaevő. Léteznek ezenkívül állati ragadozók és mindenevők, valamint további speciális táplálkozási formákat folytatók [112]. A növényevők hegyes, szívó szájszervvel, ún. szájszuronnyal rendelkeznek, ennek segítségével hatolnak a növénybe és szívják fel annak nedveit. A baktériumevők szájszerve egy lyukas csőhöz hasonlít, a gombaevők szintén rendelkeznek szájszuronnyal. A növényevőknek kitüntetett figyelem jut, elsősorban káros hatásuk miatt, az elmúlt években több monográfia is született a témában [113-114]. Növénykárosító hatást két módon is kifejthetnek, egyrészt közvetlenül, a hámshövetek vagy a

sejtfalak felsértésével és a sejt- és szövetnedvek kiszívásával, másrészt közvetve, különböző kórokozók terjesztésével.

#### 2.2.1.1. Az európai tűfonálféreg

Az európai tűfonálféreg (*Xiphinema vuittenezi* Luc, Lima, Weischer *et* Flegg, 1964 [115]) a legelterjedtebb tűfonálféreg faj Közép- és Kelet-Európában [116]. Hosszú, vékony állatok, a nőstény hossza 2,8-3,7 mm a hímé 2,8-3,4 mm. A kutikula 3 µm vastag, a test végei felé kicsit vastagabb. A szájszurony hossza 120-134 µm, az ennek folytatásaként tekinthető ún. odontofóre – melyen szárnyyszerű képződmények ülnek – pedig 65-80 µm. A farok hossza csak kis mértékben tér el a végbélnyílásnál mérhető átmérő nagyságától. A farok szélesen lekerekített, végének közepénél egy kicsi dudor található. A női ivarszerv páros, szimmetrikus, a vulva a test közepén található, nagy petével rendelkeznek. A hímek ritkák. [117]. A faj jelentős vírushordozó és mezőgazdasági kártevő [117, 118].

#### 2.2.2. A fonálféreg mint bioindikátorok

A bioindikátor olyan élőlény (vagy egy élőlény része, illetve élőlények csoportosulása), amely a környezet (vagy annak egy részének) minőségével kapcsolatban információt hordoz. A biomonitor olyan bioindikátor, mely kvantitatív információt hordoz [119]. Nagy előnye a hagyományos környezetvizsgálati módszerekkel szemben, hogy nem igényel drága eszközöket és komoly előkészületeket (pl.: drága készülékek helyszínre szállítása, őrzése stb.). A fonálféreg (illetve fonálféreg-közösségek) kiválóan alkalmazhatók bioindikációs célokra a következők miatt [98]:

1. Többféle élőhelyen is megtalálhatók, nagyon elterjedtek.
2. Permeábilis kutikulájukon keresztül közvetlen kapcsolatban vannak a környezetükkel.
3. Nem hagyják el gyorsan stressznek kitett élőhelyüket, sok fajuk meglehetősen ellenálló.
4. A talaj táplálékláncában kulcspozícióban vannak.
5. Átlátszók, ezért könnyen diagnosztizálhatók, biokémiai vizsgálatok nélkül is.
6. A táplálkozási mód könnyen azonosítható (pl. szájszurony).
7. A zavarásra gyorsan válaszolnak: a megnövekedett mikrobiális tevékenység a baktériumevők közösségen belüli részarányának megváltozásához vezet.

Ennek megfelelően a fonálférget előszeretettel alkalmazzák bioindikációs célokra, bizonyos környezeti paraméterek és azok változásának vizsgálatára, pl.: különböző mezőgazdasági

tevékenységek [120] vagy a globális felmelegedés [121] hatása. A különböző mikroelem-szennyezések hatása is gyakori kutatás tárgya [122-124].

### **2.2.3. A fonálférgek mint modellszervezetek**

A modellszervezetek különböző nem-emberi fajok képviselői, melyeket különböző biológiai folyamatok vizsgálatra használnak, a kapott eredményekből következtetések vonhatók le más (komplexebb) szervezeteket illetően [125]. A fonálférgek törzsének egyik képviselőjét, a *C. elegans*-t 1963 óta használják modellszervezetként [126]. Teste meglehetősen egyszerű felépítésű, 1000-nél kevesebb sejtje van, ugyanakkor meglehetősen komplex szervezet, mind szervrendszereit mind pedig életfolyamatait tekintve. Számos biológiai folyamat tisztázásában fontos szerepet játszott az elmúlt évtizedekben [127, 128].

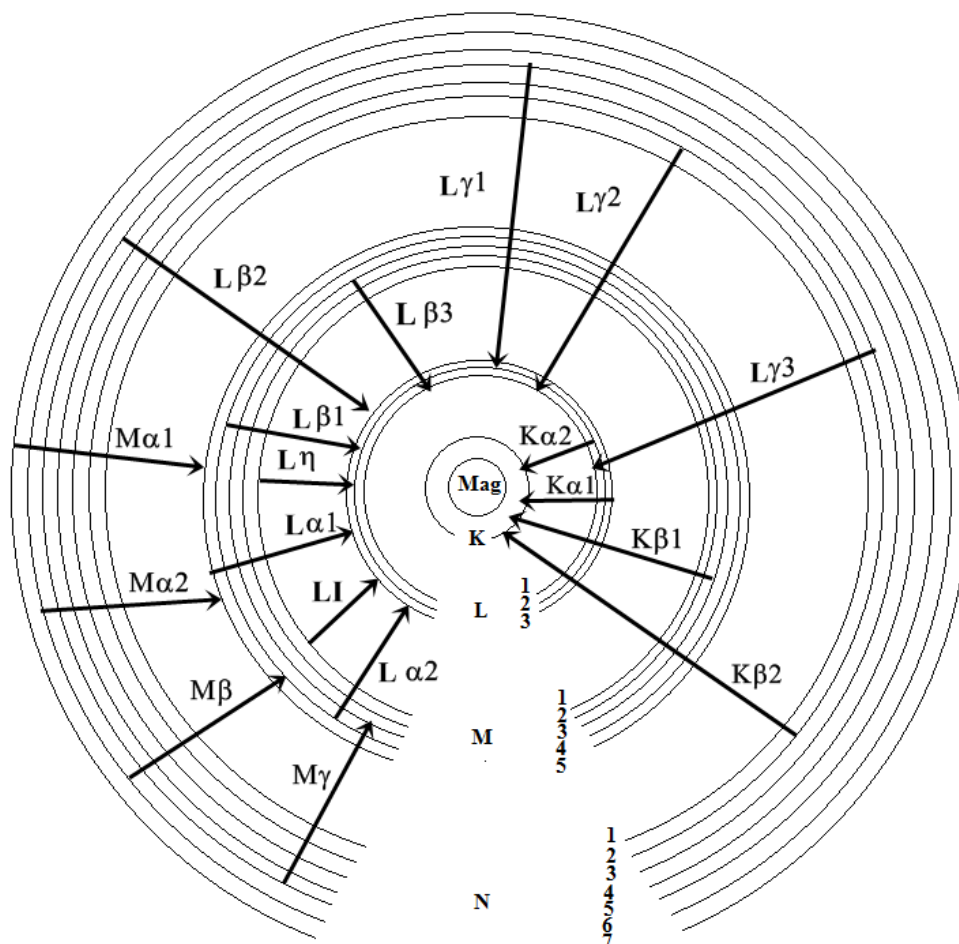
## **2.3. Műszeres módszerek**

### **2.3.1. Totálreflexiós röntgenfluoreszcens spektrometria**

#### *2.3.1.1. A röntgenfluoreszcencia*

Röntgensugárzásnak a 0,01-10 nanométeres hullámhossz- és a 0,1-100 keV energiatartományba eső elektromágneses sugárzást nevezzük. Felfedezése Röntgen nevéhez köthető [129]. Röntgensugárzás két módon keletkezhet. Ha töltött részecske gyorsulva mozog (tehát sebességének nagysága, vagy iránya megváltozik), akkor elektromágneses sugárzás forrásává válik. Az így keletkező röntgensugárzást fékezési röntgensugárzásnak nevezzük. Továbbá, ha egy atom egyik belső elektronhájáról elektront eltávolítunk, az adott héjon egy lyuk keletkezik, melyet egy magasabb energiájú héjon lévő elektron fog betölteni. A két pálya energiakülönbségének megfelelő energia pedig elektromágneses sugárzás formájában felszabadul (karakterisztikus röntgensugárzás [130]). Az összes elektronátmenet nem megengedett, csak a kiválasztási szabályoknak megfelelőek [131], a legfontosabb átmeneteket [132] a 2.2. ábra szemlélteti. Mivel az egyes energiaszintek minden különböző atomnál máshol helyezkednek el, így az egyes átmenetek energiája is más és más, az atom rendszáma és az átmenet energiája közötti kapcsolatot a Moseley-törvény szabályozza [133]. Ezek alapján egy adott minta röntgenspektrumának felvételével és az adott csúcsok beazonosításával a minta elemösszetétele jellemezhető kvalitatívan. Egy adott csúcs intenzitása pedig az adott elem mintában lévő mennyiségével arányos. Karakterisztikus röntgensugárzást több módon is létrehozhatunk, ehhez belső elektron eltávolítására van szükség, erre a célra alkalmasak töltött részecskék, pl.: elektronok vagy protonok. Az

előbbieik felhasználására épülő EPMA módszert a 2.3.2.2. fejezetben mutatom be. Karakterisztikus röntgensugárzás jöhet létre továbbá egy instabil izotóp bomlása során, belső konverzió, vagy elektronbefogása útján, utóbbi esetben az eggyel kisebb rendszámú elemre (leányelem) jellemző karakterisztikus sugárzást kapunk, kiválthatja továbbá röntgensugárzás is. Utóbbi esetben fluoreszcenciáról beszélünk, a IUPAC definíciójának megfelelően [134].



2.2. ábra: A legfontosabb röntgenátmenetek

A röntgenfluoreszcencia jelenségét használják ki analitikai alkalmazásokban. A hagyományos XRF spektrometria esetén a mintát röntgensugárzással gerjesztjük, majd a keletkező fluoreszcens sugárzást detektáljuk. A gerjesztés történhet radioaktív izotóppal [135], röntgensővel vagy szinkrotronsugárzással. A röntgenső egy anódból és egy izzókatódból áll, előbbi többféle anyagból készülhet (Pl.: Cr, Cu, Mo, W), utóbbi volfrámból. A két elektród egy csőben található légüres térben, melyre nagyfeszültséget kapcsolva a katódból elektronok lépnek ki és gyorsulva mozognak az anód felé, majd becsapódnak az anódba. Ily módon fékezési és az anód anyagára jellemző karakterisztikus röntgensugárzás is

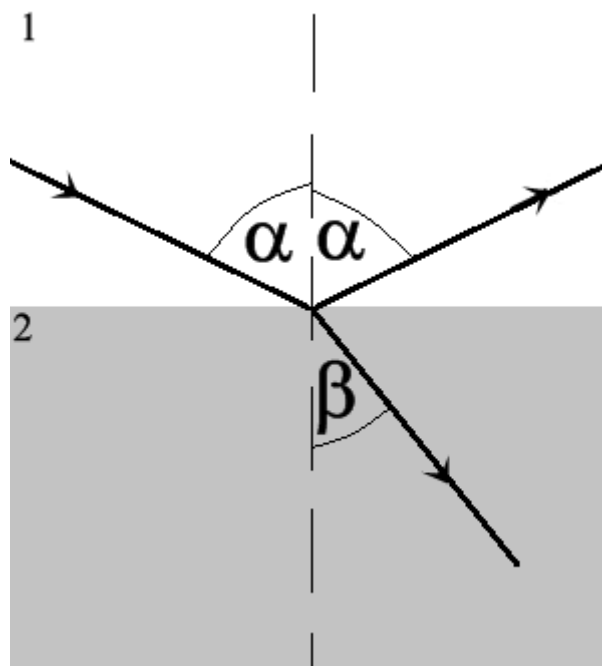
keletkezik. A fluoreszcens sugárzás detektálására két módszer kínálkozik. Hullámhossz-diszperzív detektálás esetén egy analizátorkristályt alkalmazunk, melyről adott pozíciójában, csak a Bragg-törvény [136] által megengedett hullámhosszú sugárzás verődik vissza és jut a detektorba, ami lehet proporcionális vagy szcintillációs. A kristályt forgatva a teljes hullámhossztartomány végigpásztázható. Energia-diszperzív detektálás esetén félvezető detektort alkalmazunk, melyben az adott röntgenfoton energiájával arányos számú elektron-lyuk pár keletkezik, így annak energiája meghatározható, az adott energiájú fotonok számát mérve pedig az intenzitást is meghatározhatjuk.

### 2.3.1.2. A TXRF spektrometria elve

Ha elektromágneses hullám két eltérő törésmutatójú közeg határára érkezik, ott megtörik és a Snellius-Descartes-törvénynek megfelelő szöggel lép be a másik közegbe:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{n_2}{n_1} \quad (1)$$

Ahol  $\alpha$  és  $\beta$  a beesési merőlegessel bezárt szögek az első, illetve második közegben (2.3. ábra),  $v_1$  és  $v_2$  a hullám terjedési sebessége,  $n_1$  és  $n_2$  a törésmutatója a két közegben.



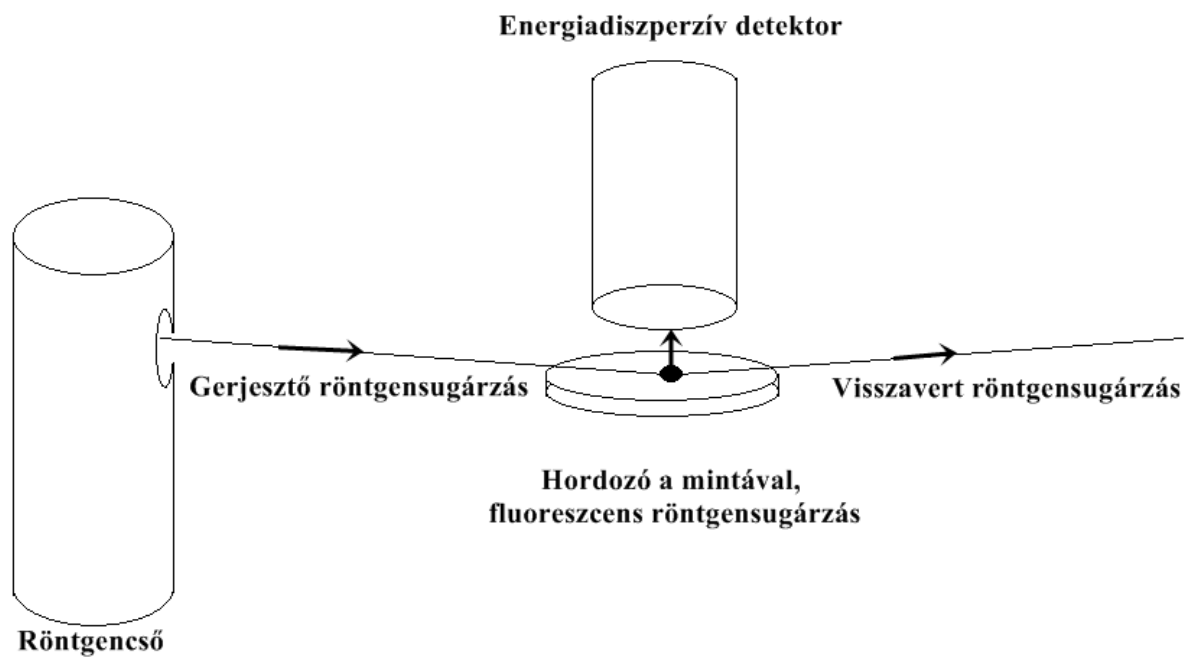
2.3. ábra: Elektromágneses sugárzás viselkedése két eltérő törésmutatójú közeg határán

A képletből látszik, hogy ha  $\alpha$  nagy ( $\sim 90^\circ$ ) és  $v_2 > v_1$ , illetve  $n_1 > n_2$ , vagyis a 2. közeg optikailag ritkább, mint az 1., akkor  $\beta$ -ra  $90^\circ$ -nál nagyobb érték jöhetne ki. Ekkor azonban a sugárzás nem lép be a 2. közegbe, hanem ún. teljes visszaverődést (totálreflexiót) szenved és a

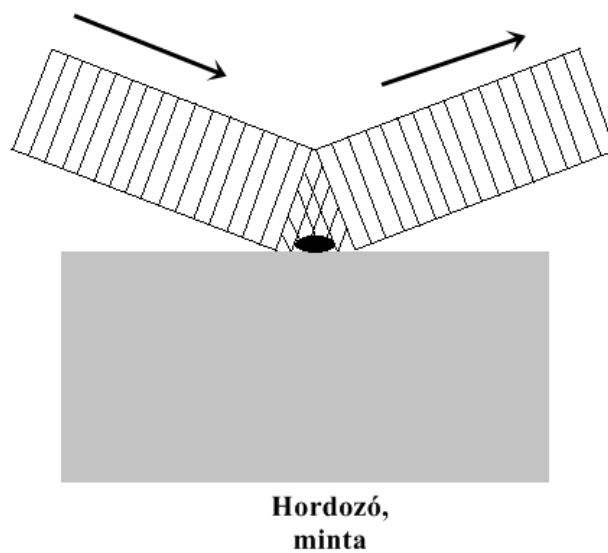


visszaverődő sugárzás  $\alpha$  fokos szöget zár be a beesési merőlegessel. Látható fény esetén ez akkor történhet meg, ha valamilyen (fizikailag) sűrűbb közegből (pl.: vízből) lép át hígabba (pl. levegőbe). A jelenség röntgensugárzás esetén is megfigyelhető, ahogy azt Compton már 1923-ban leírta [137]. Mivel a röntgensugárzás törésmutatója 1-nél kisebb érték [131], ebben az esetben a fizikailag sűrűbb közeg az optikailag ritkább. Tehát totálreflexió akkor állhat fenn, ha röntgensugárzás (fizikailag) hígabb közegből érkezik sűrűbbe. A gerjesztő röntgensugárzás levegő/mintahordozó határfelületen történő teljes visszaverődését használják ki a TXRF spektrometriában [138,139]. A totálreflexió létrejöttéhez a gerjesztő sugárzás határfelülettel bezárt szöge  $<0,1^\circ$ , tehát  $\alpha > 89,9^\circ$ . A beeső és a teljes visszaverődést szenvedett sugárzás interferenciájának következtében állóhullámok alakulnak ki. A mérési elrendezést a 2.4. A, az állóhullámok létrejöttét a B ábra mutatja. Ez a mérési geometria számos előnnyel ruházza fel a TXRF módszert a hagyományos XRF spektrometriával szemben. A hordozóra felvitt vékony rétegben gyakorlatilag nincsen mátrixhatás, méréseinket belső standard alkalmazásával végezhetjük, ennek módját és korlátait a 2.3.1.4. fejezetben ismertetem. A teljes visszaverődésnek köszönhetően a detektorba jutó szórt sugárzás mennyisége lényegesen kisebb, ezáltal jóval kisebb a spektrális háttér. A detektor is jóval közelebb helyezhető a mintához, ezáltal a fluoreszcens fotonbegyűjtés hatásfoka is nagyobb. A fluoreszcens sugárzás keltése is erőteljesebb, hiszen a beeső és a visszavert sugárzás is gerjeszt, illetve az állóhullámok hatását is figyelembe kell venni.

**A**



**B**



2.4. ábra: A TXRF spektrometria mérési elrendezése (A); állóhullámok kialakulása (B), a háromszög alakú terület a két hullám találkozásánál jelzi az állóhullám-zónát

### 2.3.1.3. A TXRF spektrométer felépítése

TXRF spektrometria esetén a műszaki háttér hasonló a hagyományos XRF-nél említettekhez, néhány eltérés azonban megfigyelhető. A megfelelő gerjesztéshez röntgensövet kell használni, ez lehet vonalfókuszú, vagy forgó anódos. Újabban terjedőben van a szinkrotronsugárzás, mint gerjesztőforrás használata XRF vizsgálatoknál, a hagyományos geometria mellett TXRF spektrometria is végezhető ily módon, ekkor SR-TXRF módszerről beszélünk [140, 141]. Leggyakrabban molibdén vagy volfrám anódú röntgensövet alkalmaznak, kis rendszámú elemek mérésére alkalmas berendezésekben króm anódút. A csőből kilépő sugárzás tulajdonságainak módosítására van szükség, ezen célra alkalmaznak kollimátort, szűrőt, egyszeres vagy többszörös reflektort, monokromátort. A kollimátor a gerjesztő sugárzás geometriai alakjának megváltoztatására szolgál, segítségével kb. néhány 10  $\mu\text{m}$  vastag, sávszerű sugárzást hozhatunk létre. A másik három eszköz a gerjesztő röntgensugárzás spektrális eloszlásának megváltoztatására szolgál. Monokromátorra vékonyrétegek vizsgálata esetén van szükség, hagyományos analízisnél elegendő a szűrő és a reflektor. Utóbbi feladata a gerjesztő sugárzás nagyenergiájú tartományának kiszűrése (az angol szaknyelvben low-pass filternek hívják), erre azért van szükség, mert a nagyobb energiájú sugárzás kevésbé képes totálreflexióra, szóródása növeli a háttérrel [142]. A mintát nagy reflektivitással rendelkező, kis felületi érdességű hordozóra kell felvinni, a szükséges paramétereket monográfiák tartalmazzák [132], a kereskedelmi forgalomban kapható hordozók teljesítik ezeket a követelményeket. Kémiai ellenálló anyagból célszerű készíteni őket, egyrészt annak érdekében, hogy agresszív minták (pl. savak, szerves oldószerek) is vizsgálhatók legyenek, illetve hogy tisztítani lehessen őket (szintén agresszív reagensekkel) a többszöri felhasználás érdekében. A plexiből készült lapok nem felelnek meg ennek a követelménynek, de olcsó beszerzési árak következtében többszöri felhasználásukra nincs is szükség, viszont csak nem reaktív minták (közel semleges vizes oldatok, szuszpenziók) vizsgálhatók segítségükkel. Kémiai ellenálló hordozók: kvarc, üvegszerű szén (glassy carbon), bór-nitrid, szilícium, germánium. Hátrányuk magas árak, továbbá a hordozóban jelen lévő kémiai elemek, melyek vizsgálhatók lennének TXRF módszerrel (Si, Ge), nem elemezhetők ezek felhasználásával. A mintapozícionáló egység lehet fix vagy változtatható szögű, utóbbira vékonyrétegek vizsgálata esetén van szükség. A mérések automatizálhatók mintaváltó segítségével. A TXRF spektrometriában energia-diszperzív detektorra van szükség. Erre a célra félvezető detektorokat használnak, több lehetőség kínálkozik: Si(Li) (esetleg Ge(Li)), HPGe detektor, illetve az utóbbi időkben már gyártanak SDD-t tartalmazó TXRF készüléket, melynek óriási előnye, hogy nincs szüksége folyékony nitrogénes hűtésre.

Utóbbiakat előszeretettel alkalmazzák hordozható TXRF készülékekben [143]. A regisztráló egység feladata a detektor jeleinek feldolgozása, tulajdonképpen a spektrum elkészítése. A beérkező jelet erősíteni, digitalizálni kell, majd pedig összegyűjteni. Ezeket a feladatokat végzi az előerősítő, erősítő, analóg-digitális konverter és a sokcsatornás analizátor. Részletesebb leírás található az egység felépítéséről az irodalomban [132]. Az energia-diszperzív detektálás a 2.3.1.1. fejezetben ismertetett elvnek megfelelően történik.

#### *2.3.1.4. A TXRF spektrometria gyakorlata, analitikai teljesítményjellemzői*

Ahogy a korábbi fejezetben említésre került, ha megfelelő a mintaelőkészítés, akkor gyakorlatilag mátrixzavarástól mentes módszerként alkalmazható a TXRF spektrometria. Ehhez az előző fejezetben említett tulajdonságú hordozóra kell a mintát vékony rétegben felvinnünk. A mintaréteg vastagságát több tényező befolyásolja. Először is az állóhullámok által gerjesztett háromszög alakú terület magassága kb. 10-15  $\mu\text{m}$ , következésképpen a rétegvastagságnak mindenképpen 15  $\mu\text{m}$ -nél kisebbnek kell lennie. A rétegvastagság maximum értékét további tényezők korlátozzák, egyrészt a detektor limitált fotonszámlálási képessége, másrészt a mátrix önabszorpciója [144]. Megfelelő analitikai kalibrációs módszert alkalmazva (belső standard-es, vagy standard addíciós kalibráció) utóbbi hatás kiküszöbölhető. Az előbbi hatás miatti rétegvastagság az adott mátrix sűrűségét és a lehetséges maximális felületi sűrűséget figyelembe véve számítható. Klockenkamper az alábbi értékeket állapítja meg három különböző mátrixra: szerves szövet ( $^1\text{H}$ - $^8\text{O}$ ): 12  $\mu\text{m}$ ; ásványi por ( $^8\text{O}$ - $^{20}\text{Ca}$ ): 0,7  $\mu\text{m}$ ; fémkenet ( $^{24}\text{Cr}$ - $^{30}\text{Zn}$ ): 0,01  $\mu\text{m}$  [132]. A vastagságnak egy alsó határt meg kell haladni, egyrészt kimutathatósági, másrészt elvi okból, a minimum értékek a fent említett három mátrixra rendre a következők: 0,2  $\mu\text{m}$ ; 0,05  $\mu\text{m}$ ; 0,015  $\mu\text{m}$  [145]. Belső standard alkalmazása esetén azonban ez az érték kisebb, mindhárom mátrixra 15 nm, szintén Klockenkamper megállapítása szerint.

TXRF spektrometria segítségével kb. 80 elem detektálható. A kis rendszámú elemek ( $Z < 14$ ) detektálása problémát jelent, mivel ebben az esetben a detektálandó K-vonal energiája kicsi ( $< 1,5 \text{ keV}$ ), ezért hajlamosabb az abszorpcióra, ezenkívül ebben az energiatartományban a gerjesztő sugárzás szórása is jelentősebb, ezáltal nagyobb a spektrális háttér. Speciális TXRF spektrométerrel (ún. low-Z spektrométer) a kis rendszámú elemek kimutatásában is komoly eredményeket értek el az elmúlt években [146-148]. A legfontosabb különbségek a konvencionális spektrométerhez képest: mérés vákuumban, gerjesztés kisebb energiával (króm vagy szkandium anódú röntgenső, illetve szinkrotronsugárzás), ultravékony detektorablak. Nyomelem-analízisnél a legintenzívebb csúcs megléte elegendő az

azonosításhoz (a többi nem is nagyon detektálható), egyéb esetekben azonban legalább két nagy intenzitású vonalnak jelen kell lennie a spektrumban, és ezek intenzitásaránya is meg kell, hogy feleljen az elméleti értéknek. Kvantitatív analízisnél alkalmazható a standard addíció módszere és a belső standard kalibráció. Előbbi esetben ismert mennyiségekben adjuk az adott elemet a mintához, majd a kapott csúcsterület-koncentráció függvényre egyenest illesztünk, 0 intenzitásra extrapolálva a kapott koncentráció érték a valódi koncentráció -1-szerese. Többeleemes analízisnél a belső standard módszert alkalmazzuk. Ehhez olyan elemet kell választani, amely nincs a mintában. Előzetes mérések során meghatározzuk a belső standard és az adott (későbbiekben vizsgálandó) elem(ek) relatív érzékenységet. Ehhez a belső standard-et és az analizálandó elemeket is ismert koncentrációban tartalmazó oldatot vizsgálva meg kell határoznunk a csúcsterületeket. A relatív érzékenység függ a röntgencsőtől, az alkalmazott feszültségtől, a szűrőtől és/vagy a monokromátortól. Ha ezekben változás áll be, akkor a relatív intenzitásokat újra meg kell határozni. Ezután az analízis úgy történik, hogy a mintához hozzáadjuk a belső standard-et, homogenizáljuk, majd a hordozóra való felvitel után elvégezzük a mérést. Ismerve a belső standard koncentrációját, a relatív érzékenységet és mérve az ismeretlen elemhez és a belső standard-hez tartozó csúcsterületet, annak koncentrációja számolható. A legtöbb esetben folyadékmintát kell analizálni, a minta vagy eredetileg is folyadék halmazállapotú, vagy savas roncsolással készült, ezek mérése rutinszerű, így a TXRF spektrometria oldatos technikaként alkalmazható. Közvetlenül vizsgálhatók továbbá finom porok szuszpenzióként, légköri aeroszol közvetlenül a mintahordozóra gyűjtve [149], egyedi részecskék, pigmentek olajfestményekről (fültisztító pálcikával begyűjtve) [150] vagy metszetek biológiai mintákból [151]. A hagyományos oldatos módszer mellett a roncsolás közvetlenül a mintahordozón is végezhető, kis mennyiségű tömény sav ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  vagy  $\text{HCl}$ ;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  TXRF módszernél nem alkalmazható) hozzáadásával, akár mikrohullámmal segített módon is. További lehetőség – melyet a szerves mátrix eltávolítására előszeretettel alkalmaznak – a hidegplazmás roncsolás [152].

A TXRF módszer analitikai teljesítményjellemzői lehetővé teszik modern mikroanalitikai technikaként történő használatát, felveszi a versenyt egyéb műszeres atomspektroszkópiai módszerekkel. A TXRF dinamikus tartománya 4 nagyságrend körüli, speciális körülmények közt 6 nagyságrend is elérhető (a röntgencső áramának vagy a mérési idő változtatásával). Ezen tulajdonságával a TXRF megelőzi GFAAS-t (2-3), de elmarad az ICP-MS-től (8-9). A detektálási határ majdnem minden elemre 1-10 pg körüli. Ennek megfelelően kis mintatérfogat esetén (5-10  $\mu\text{l}$ ) is vizsgálható a  $\mu\text{g/L}$ -es koncentrációtartomány.

Fémszennyezések esetén  $10^{10}$  atom/cm<sup>2</sup> mutatható ki, szinkrotronsugárzást alkalmazva gerjesztőforrásként a  $10^8$  atom/cm<sup>2</sup> tartomány is elérhető 1000 s mérési idővel [140]. A TXRF spektrometria nagy előnye a készülék viszonylag alacsony beszerzési ára, illetve a rendkívül alacsony karbantartási és fenntartási költségek. Egyedül a detektor folyékony nitrogénnel való hűtése jelent komolyabb kiadást. A TXRF spektrometria rendkívül széles körben alkalmazható. A biológiai alkalmazásokat a következő fejezetben ismertetem. További alkalmazási példák: vízminták [153], légköri aeroszol [149], ásványi és étolaj [154], ipari alkalmazások (nagy tisztaságú szilícium és alumínium szennyezőinek meghatározása) [155], régészeti [150] és kriminalisztikai alkalmazások (szervetlen pigmentek, textilszálak, tinták) [156]. A hagyományos elemanalitikai vizsgálatokon túl változtatható beesési szögű gerjesztést alkalmazva adott szennyező típusa (bulk, vékonyréteg vagy részecske) megállapítható, vagy mélységi analízis végezhető [157-159].

#### *2.3.1.5. A TXRF spektrometria biológiai alkalmazásai*

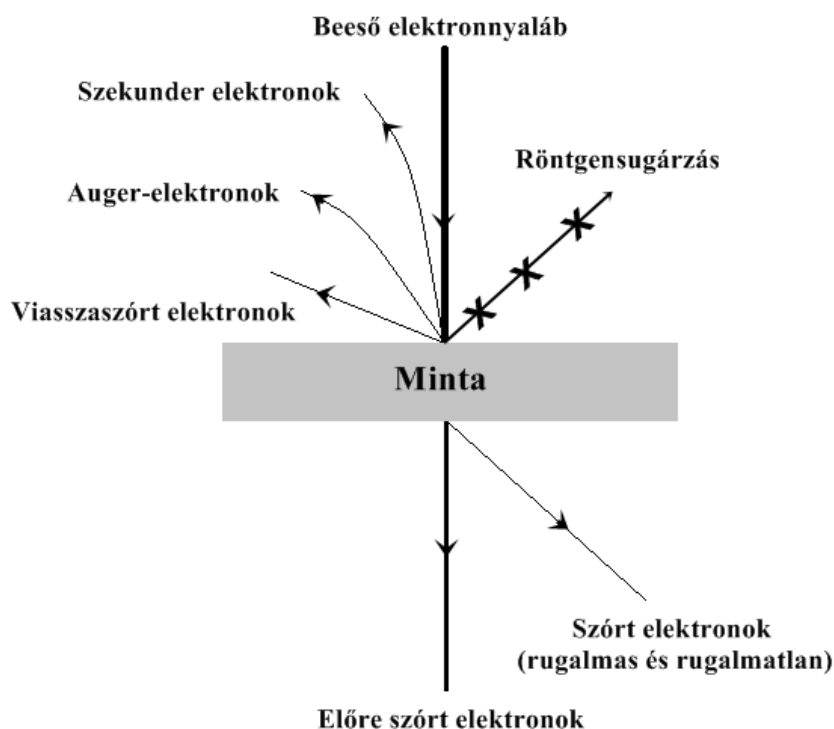
A TXRF spektrometria rendkívül széles körben alkalmazható biológiai minták vizsgálatára, ezt bizonyítja a 2009-ben megjelent, ezzel a témával foglalkozó összefoglaló jellegű közlemény is [160]. Természetes mátrixuktól elválasztott makromolekulák (fehérjék [161-163], pl. a 2.1.1.1. fejezetben említett citkróm-c oxidáz [164]; nukleinsavak [165]) vizsgálatára megfelelő módszer a TXRF spektrometria. Ebben az esetben és biológiai folyadékok vizsgálatánál is a módszer nagy előnye a kis mintaigény. A legkülönbébb folyadékok vizsgálatát végezték el roncsolással és bizonyos esetekben anélkül (utóbbiak hivatkozása zárójelben szerepel): vizelet [166], ([167]); vér [168]; vérszérum [169], ([170]); magzatvíz [171], ([172]); agyvíz ([173]); tea [174], növények xilémnedve ([175]). Sejtek vizsgálata végezhető hagyományos módon, a roncsolt minta lapra történő felcseppentésével [176, 177]. Szoboszlai munkatársaival kifejlesztett egy módszert, melynek segítségével a sejtek közvetlenül a mintahordozóra juttathatók és azon roncsolhatóak [178], direkt analízisen alapuló módszert is fejlesztettek SR-TXRF illetve XANES vizsgálatokhoz [179]. Állati [180-182], növényi [183-185] és emberi (főként rákos [186-188]) szövetek vizsgálatára is előszeretettel alkalmazzák a TXRF spektrometriát. A mintaelőkészítés az előbbieken említett módokon történhet (roncsolás, roncsolás vagy hamvasztás a mintahordozó lapon, metszet felvitele a lapra).

### 2.3.2. Pásztázó elektronmikroszkópiai módszerek

Bár a SEM módszer eredeti célja a képalkotás [189], az anyag és elektronsugárzás kölcsönhatásának köszönhetően röntgensugárzás is keletkezik, ezen előnyös tulajdonság egyszerűen kihasználható a SEM berendezés röntgendetektorral történő kiegészítésével. A mai modern készülékek általában alapfelszerelésként tartalmazzák a detektort. A legmodernebb készülékeket gyakran felszerelik további eszközökkel, például az ún. FIB egységgel, így az alkalmazások köre tovább bővíthető. A következőkben áttekintem az elektronsugárzás anyaggal való kölcsönhatását, az elektronmikroszkópos detektálási módokat, valamint röviden ismertetem az EPMA és FIB módszereket, majd külön kitérek a biológiai alkalmazásokra.

#### 2.3.2.1. Az elektronsugárzás kölcsönhatása az anyaggal

A SEM módszer alkalmazásakor valamilyen mintát teszünk ki elektronsugárzásnak, melyet az ún. elektronágyú állít elő, mely lehet izzókatódos vagy téremissziós forrás, az elektronok elektromos térben gyorsulnak a szükséges energiára [190]. Az elektronsugárzás és a minta közötti kölcsönhatást szemlélteti vázlatosan a 2.5. ábra.



2.5. ábra: Az elektronsugárzás kölcsönhatása az anyaggal

Az elektronok fókuszálása elektromágneses lencsékkel történik, a mintát az elektronsugárzás végigpásztázza ún. pásztázó tekercsek segítségével. Detektálás során a 2.5. ábrán bemutatott részecskék valamelyikét gyűjtjük. SEM technika alkalmazása esetén általában vastag mintát vizsgálunk, melyen az elektronsugárzás nem jut keresztül, ekkor csak a besugárzási oldalon létrejövő részecskéknek van jelentősége. A másik oldalon keletkezőket a transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) vizsgálja. A modern SEM berendezések lehetővé teszik a (megfelelően vékony) minta átvilágítását, ebben az esetben pásztázó transzmissziós elektronmikroszkópiáról (STEM) beszélünk [191]. Detektálás szempontjából transzmissziós a módszer, de a képalkotás módja (soros pásztázás) szemben a TEM párhuzamos (a képpontok egyszerre jönnek létre) képalkotásával. Ebben az esetben az előre szórt és a kis szögben rugalmasan szóródott elektronokat használjuk fel a detektálásra. A beeső sugárzás oldalán keletkező szekunder elektronok és visszaszórt elektronok is alkalmazhatók képalkotásra. Előbbiek a mintából lépnek ki, kis energiájúak ( $E < 50$  eV), kis mélységből (1-10 nm) származnak, utóbbiak a beeső nyaláb nagyszögű szórást szenvedett részecskéi. A visszaszórt elektron képen rendszámfüggést tapasztalunk (ún. Z-kontrasztos kép). A megfelelő kép elkészítéséhez a mintának vezetőnek kell lennie, ellenkező esetben töltés-felhalmozódás lép fel, ami rontja a kép minőségét. A szigetelő mintákat ezért vékony vezető réteggel szokták bevonni (arany vagy szén a mintára párologtatva). Az utóbbi időben elterjedőben van egy másik megoldás, az ún. alacsony vákuum üzemmódban történő mérés. Ekkor a szokásos nagyvákuumtól eltérően nagyobb nyomás van a kamrában (0,01-130 Pa). Manapság már ún. környezeti üzemmódban (130-2700 Pa) is végezhetők mérések, ennek főleg biológiai minták vizsgálata esetén van nagy jelentősége. Az elektronmikroszkópban röntgensugárzás is keletkezik, fékezési és karakterisztikus is. Utóbbi létrejöttével kapcsolatban a röntgenfluoreszcenciánál elmondottak érvényesek (karakterisztikus vonalak, analitikai jelentőség) a különbség csak abban van, hogy az elektron eltávolítása a minta atomjaiból elektronsugárzással történik. Az elektron atomból történő eltávozásakor, a karakterisztikus röntgensugárzás kibocsátása mellett van egy másik lehetőség az energiatöbblettől való megszabadulásra: egy újabb elektron kilökődése az atomból. Ezt az elektront Auger-elektronnak hívjuk, detektálása analitikai szempontból jelentős (Auger-elektron spektroszkópia [192]).



### 2.3.2.2 *Elektronsugaras mikroanalízis*

Elektronsugaras mikroanalízis során a mintát elektronsugárzásnak tesszük ki, és a keletkező karakterisztikus röntgensugárzást detektáljuk, kis mintatérfogat ( $\mu\text{m}^3$ -es nagyságrend) analitikai vizsgálatára van lehetőség,  $Z > 3$  elemek vizsgálhatók, az elektronmikroszkópiában elengedhetetlen vákuumnak köszönhetően a kis energiájú röntgenvonalak is mérhetők. A felső határt a mérendő röntgenvonal energiája tekintetében az elektronnyaláb energiája határozza meg. A módszer kvalitatív vizsgálatok mellett kvantitatív analízisre is lehetőséget nyújt. Utóbbi azon alapszik, hogy egy ismert összetételű standard-ben mérjük az adott elem intenzitását, majd ugyanazt megteszük a mintánkban, az intenzitások aránya pedig egyenlő a koncentrációk arányával, ez azonban csak egy gyenge közelítés, hiszen a két minta mátrixa szükségszerűen eltérő. A mátrixhatásokat különböző matematikai módszerekkel próbálják figyelembe venni, ezek közül a legismertebb az ún. ZAF-korrekciónak [193]. A Z a rendszámfüggést jelöli, két tényező is rendszámfüggő: a visszaszórt elektronok (melyek nem tudnak elektront kiváltani a mintából) keletkezési határfoka, amely Z növekedésével növekszik és az elektronfékezési erő, ami viszont fordított tendenciát mutat. Az A a keletkező röntgensugárzás mintában való abszorpcióját veszi figyelembe. Az F a fluoreszcenciára utal, megtörténhet ugyanis, hogy a keletkező röntgensugárzás távolít el elektront egy mintában lévő atomról, ekkor fluoreszcens sugárzás keletkezik, növelve ezzel a gerjesztett elemnek a jelét. Utóbbi jelenségnek kis rendszámú elemek esetén van nagyobb jelentősége. A módszer iteratív módon működik – hiszen Z, A és F mátrixfüggőek, a mátrix összetételét pedig nem tudjuk –, tehát van egy első közelítés, majd ezt finomítjuk tovább.

Az EPMA módszernek a fentiekben vázolt hagyományos analitikai felhasználása mellett további alkalmazásai is lehetségesek, annak köszönhetően, hogy a gerjesztés egy szűk nyaláb segítségével pontról-pontra történik: elemeloszlási térképeket is készíthetünk a segítségével. Bár ma már 1 nm-es elektronnyalábot is elő tudnak állítani, az elemtérkép felbontásánál nyilván a gerjesztési térfogatot kell figyelembe venni, ami lényegesen nagyobb, a módszer felbontása: 0,1-1  $\mu\text{m}$ . Kimutatási határa 100-1000  $\mu\text{g/g}$ , ez meglehetősen nagy, tehát nyomanalízisre sajnos nincs lehetőség. Az analitikai mélység (ahonnan még kapunk információt) 0,1-1  $\mu\text{m}$ . A megadott adatok biológiai mintákra vonatkoznak [194].

### 2.3.2.3 *Fókuszált ionsugaras megmunkálás*

A modern SEM berendezésekbe beépítenek ún. FIB egységeket, melyekkel a műszer alkalmazási területe kibővíthető. A FIB legtöbb esetben  $\text{Ga}^+$ -ionokból áll, melyet az ún. folyékony fémion forrás [195] hoz létre. A galliumot egy tartályban tárolják, mely egy

volfrámtűn keresztül juttatható ki, kihúzófeszültség alkalmazásával, ekkor megtörténik az ionizáció is. A nyalábot kondenzor lencse formázza meg, fókuszálását az objektív lencse végzi. Az ionsugárzás anyaggal való kölcsönhatása hasonló az elektronsugáréhoz. Az ionok is képesek elektront eltávolítani, tehát keletkeznek elektronok, röntgenfotonok, keletkezhetnek továbbá szekunder ionok, valamint porlasztott részecskék. Ennek megfelelően a FIB felhasználása széleskörű, az elektronokat detektálva készíthető kép, hasonlóan a SEM szekunder elektron detektálásához [196], de akár a szekunder ionok is detektálhatók. A minta porlódása lehetővé teszi a minta megmunkálását, metszetek készítését [197]. Az ionáramot és a pásztázás módját változtatva különböző feladatokat végezhetünk: vágás (nagyobb áramerősséggel), tisztítás (kisebb áramerősséggel). Hasonló módon készíthetünk a TEM vizsgálatokhoz szükséges nagyon vékony mintát [198]. További alkalmazása a FIB-nek a kémiai rétegleválasztás [199], ennek során valamilyen prekursor gázt juttatunk a mintatérbe, majd az ionnyalábbal történő kölcsönhatás következtében egy réteget alakíthatunk ki előre definiált helyen és formában. Ezt a műveletsort egyébként elektronsugárzás alkalmazásával is elvégezhetjük. FIB vágásoknál ilyen réteggel védhetjük a mintát, ez segítséget nyújt roncsolás és szennyezésmentes keresztmetszet kialakításában.

#### *2.3.2.4. Biológiai alkalmazások*

Biológiai minták SEM-FIB vizsgálata egyéb (pl. geológiai, ipari) anyagokhoz képest komolyabb előkészületeket igényel. Ennek oka, hogy ezen minták kevésbé állnak ellen a nagyvákuum és a nagy intenzitású sugárzás (töltött részecskék, röntgenfotonok) károsító hatásainak, nagy víztartalmuk miatt. A vizet tehát el kell távolítani a mintákból, a minta eredeti struktúrájának megőrzése mellett, utóbbi különösen fontos, ha a minta szerkezetét (SEM) vagy a benne lévő kémiai elemek eloszlását (EPMA) vizsgáljuk [200]. Biológiai minták SEM vizsgálatára az egyik lehetőség a korábban említett környezeti üzemmód [201], elemtérképek is készíthetők így, a FIB használatára azonban ekkor nincs lehetőség. További speciális üzemmódot igénylő módszer az alacsony hőmérsékletű SEM, a mintát fagyasztjuk (kriofixálás), majd így vizsgáljuk [202]. A minta víztartalmának eltávolítása struktúrájának megőrzése mellett a következő módokon történhet: szuperkritikus szárítás (a mintában lévő vizet szén-dioxidra „cseréljük”, majd azt kritikus hőmérsékletén eltávolítjuk) [203], gyorsfagyasztás majd liofilizálás (fagyasztva szárítás vákuumban) [204], kémiai fixálás (különböző vegyszerekkel, például glutáraldehiddel vagy ozmium-tetroxiddal) [205].

A SEM módszert évtizedek óta használják biológiai minták szerkezetének vizsgálatára [206], a FIB használatával még pontosabb információk nyerhetők [207]. Az EPMA széles

körben használható biológiai minták vizsgálatára. A biológiai szempontból fontos kis rendszámú elemek vizsgálatára (C, N, O, P, S, Na, Mg, K, Ca) kiválóan alkalmas. Bár a kimutatási határok elég magasak, megfelelően megválasztva a kezelőszer koncentrációját, mesterséges kezeléssel bevitt elemek is vizsgálhatók. Lehetőség van koncentráció meghatározására, adott elemeknek a sejt különböző részeiben történő felhalmozódásának vizsgálatára, egy-, kétdimenziós, sőt FIB-et is alkalmazva háromdimenziós elemeloszlási vizsgálatokra [208]. EPMA természetesen TEM-et használva is végezhető. A 2.4. táblázat az elmúlt évek biológiai mintákon végzett EPMA-vizsgálatait foglalja össze.

Minta	Módszer	Mintaelőkészítés	Hivatkozás
<i>Alyssum lesbiacum</i> (növény)	SEM; elemtérkép: Ni, Ca; koncentráció: Ni, K, Ca, Mg	Fagyasztás, öt napos szárítás vákuumban	[209]
<i>Nerium oleander</i> (növény)	SEM; összetétel több helyen: 14 elem	Fagyasztás folyékony nitrogénben	[210]
<i>Cannabis sativa</i> (növény)	SEM és TEM, Cu vizsgálata több helyen	SEM: szuperkritikus szárítás TEM: kémiai fixálás	[211]
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> (baktérium)	SEM; elemtérkép: Ca; detektálva: P, S	Dehidratálás etanollal, majd szuperkritikus szárítás	[212]
<i>Chelonia mydas</i> (teknős) tojásbéja	SEM; elemtérkép: Ca; koncentráció: 11 elem	Vizsgálat közvetlenül	[213]
<i>Pinctada margaritifera</i> (gyöngy-kagyló) háza	SEM; elemtérkép: Na, Cl, Mg, Sr	Polírozás, néhány minta savas és enzimes maratása	[214]
Gyűrűsférgek	SEM; elemtérkép: 11 elem	Kriofixálás	[215]
Gyűrűsférgek	TEM; koncentráció: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Zn	Nedvességeltávolítás jég-hideg szacharóz-oldattal	[216]
Emberi agyszövet	SEM; C, O, P, S, Ca, Mg vizsgálata	Fixálás formaldehiddel	[217]
Emberi vörösvértestek	TEM; Na, K, Fe elemtérkép és koncentráció	Fagyasztás, majd liofilizálás	[218]

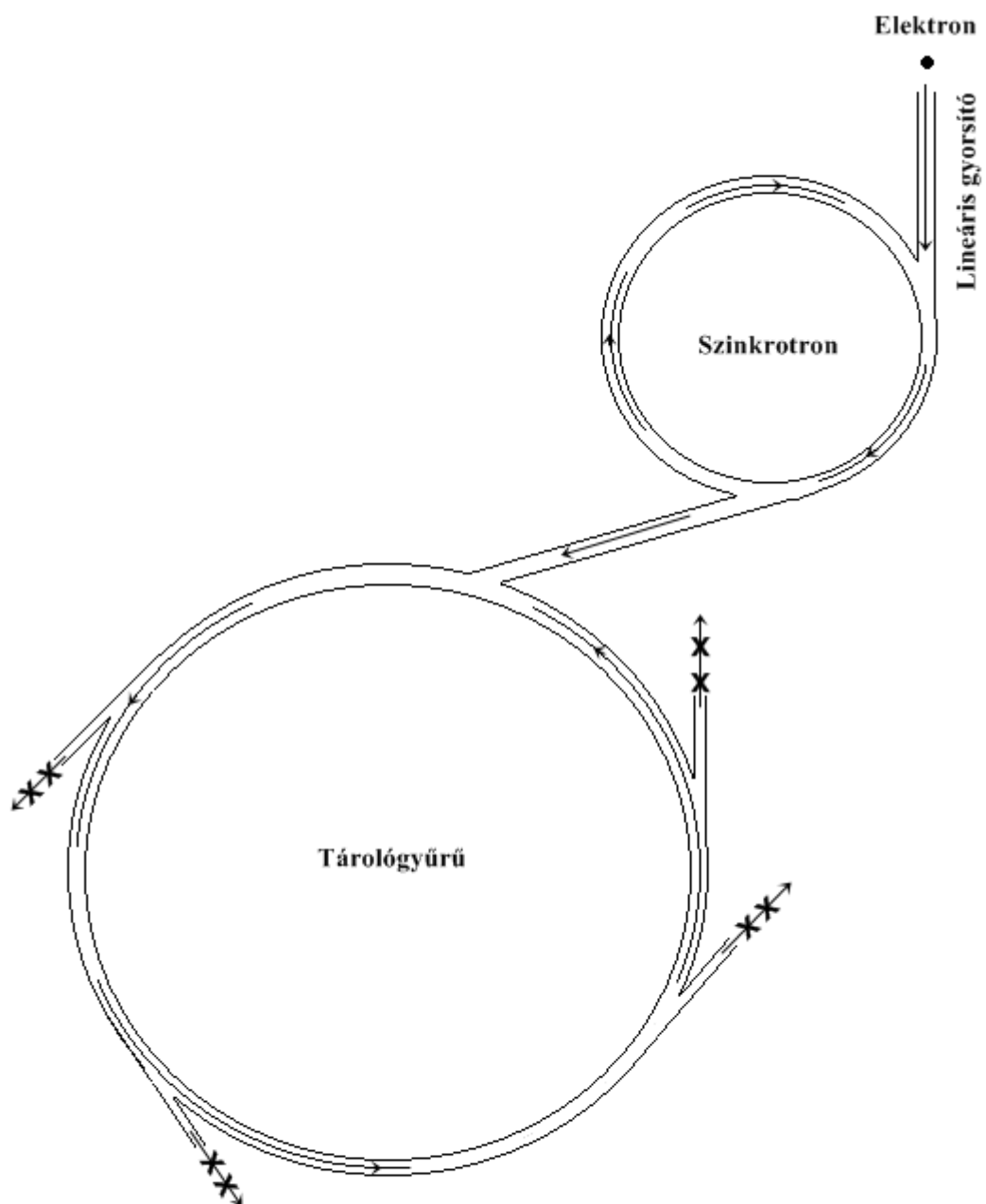
2.4. táblázat: Biológiai minták EPMA vizsgálata

### 2.3.3. XANES spektrometria

#### 2.3.3.1. A szinkrotronsugárzás

Relativisztikus sebességgel mozgó töltött részecske mozgásállapotának megváltozásakor szinkrotronsugárzás keletkezik. A szinkrotronsugárzás nagy intenzitású, széles

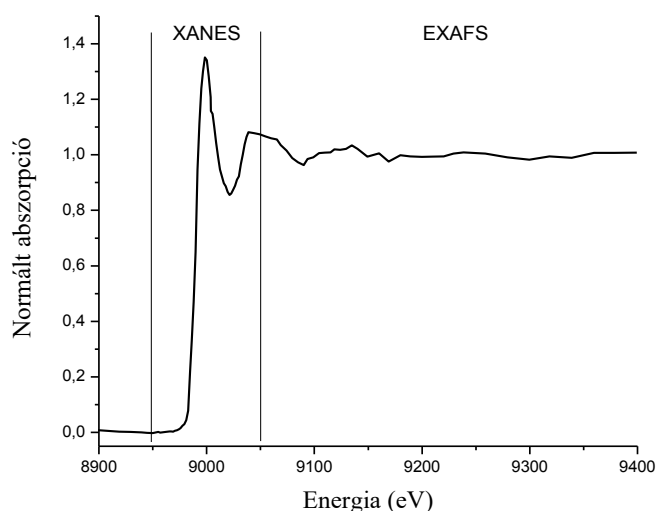
energiaeloszlású elektromágneses sugárzás: spektrális tartománya az infravöröstől a kemény röntgensugárzásig terjed.



2.6. ábra: A szinkrotronsugárzás előállítása

Korábban a részecskefizikai kísérletekhez épített szinkrotronokban a sugárzás, mint „hulladéksugárzás” jelentkezett és azt „parazita” módon használták: ún. első generációs szinkrotronok. Később már kifejezetten a szinkrotronsugárzás alkalmazására építettek sugárforrásokat (második generáció). A szinkrotron sugárforrásokban (2.6. ábra) egy elektronforrásból kilépő részecskét gyorsítunk először egy lineáris gyorsítóban, majd a szinkrotronyűrűben, innen kerülnek az elektronok a tárológyűrűbe. Az elektronokat terelőmágnesek tartják a pályán, az energiavesztésüket rádiófrekvenciás úton pótolják. A szinkrotronsugárzás érintőirányban lép ki a tárológyűrűből, ma már speciális mágneses eszközöket alkalmaznak (harmadik generáció), melyekkel a keletkező sugárzás optimálható [219]. A szinkrotronsugárzás számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik. Intenzitása a hagyományos röntgensővel előállítotténál több mint 10 nagyságrenddel nagyobb. Az elektronpálya síkjában magas a polarizációfoka, ez előnyös röntgenfluoreszcens vizsgálatoknál. A sugárzás vízszintes irányban széttartó, de függőlegesen jól kollimált. A kibocsátott sugárzás impulzusos természetű, ez időbeli felbontásos vizsgálatokat tesz lehetővé. Ennek megfelelően a szinkrotronsugárzásnak számos alkalmazási területe van, pl.: tomográfia [220]; röntgendiffrakció, akár egy átalakulás időbeli követésére [221]; rugalmatlan röntgenszórás (szerkezetkutatás) [222]. A nagy intenzitásnak és megfelelő röntgenoptikai eszközök kifejlesztésének köszönhetően röntgenfluoreszcens spektroszkópiai mérésekkel nyomelem-eloszlás is vizsgálható [223], akár három dimenzióban is [224].

#### 2.3.3.2. A XANES spektrometria elve és gyakorlata



2.7. ábra: Réz-acetát atomabszorpciós spektruma (saját felvétel, lásd kísérleti rész)

Egy adott elem röntgenabszorpciós spektrumát (az abszorpció mértéke az alkalmazott röntgensugárzás energiájának függvényében) felvéve azt tapasztaljuk, hogy az abszorbancia csökken az energiát növelve, de bizonyos pontokon éles törést mutat, és ezeken a helyeken megnövekszik. A spektrum ezen energiákhoz tartozó pontjait abszorpciós élnek nevezzük. Ezeken a helyeken a besugárzott energia pont egy adott elektron eltávolításához elegendő. Ennek megfelelően beszélünk K, L és M élről, attól függően, hogy honnan távolítottuk el az elektront. Az abszorpciós élnek finomszerkezete is van, melyet az adott elem kémiai környezete befolyásol és megfelelő felbontással ki is mérhetjük. Bár elvi különbség nincsen, praktikus okokból a spektrumot két tartományra szokták osztani: XANES és EXAFS (2.7. ábra). A finomszerkezetet befolyásolják a szomszédos atomok, hiszen a kilépő, röntgensugárzás által kiváltott, ún. fotoelektronok (a távozó és a szomszéd atomról visszaverődött) hulláma interferenciába kerül egymással, ez befolyásolja a spektrum alakját. Az EXAFS tartomány az abszorpciós éltől kb. 50 eV-ra kezdődik, de ez nem szigorú határ. Ebben a tartományban az egyszeres szórások dominálnak, mert a viszonylag nagy gerjesztési energia miatt a fotoelektron energiája is nagy, közepes szabad úthossza pedig kicsi. Ennek megfelelően az abszorbeáló atom közvetlen szomszédjairól, vagyis az első koordinációs szféráról kapunk információt az EXAFS spektrometria segítségével. Kvantitatív elemzésre van lehetőség, a folyamat leírható egy egyenlettel [225]. Meghatározhatók a kötéshosszok és bizonyos korlátokkal a szomszédos atomok, a rendszámfüggés nem túl érzékeny, ezért csak nagyobb rendszámkülönbséggel rendelkező atomokat lehet megkülönböztetni (pl. oxigén és kén, de oxigén és nitrogén nem).

A XANES spektrum elméleti leírása sokkal nehezebb feladat, ezért inkább összehasonlító vizsgálatokra használják, bár próbálkoznak a kvantitatív értelmezéssel is [226, 227]. Ebben az esetben ugyanis a fotoelektron közepes szabad úthossza nagyobb, ezért többszörös szórás is lehetséges, emiatt a kvantitatív leírás sokkal bonyolultabb. Ugyanakkor a XANES spektrometria jóval érzékenyebb az abszorbens atom kémiai környezetére, mint az EXAFS, sok hasonló vegyület EXAFS spektrumában nem venni észre különbséget, de a XANES-ban igen. A spektrum ujjlenyomatként szolgál, összehasonlító vizsgálatokra kiváló lehetőséget nyújt. A XANES spektrum egyik legfontosabb jellemzője az él pozíciója, ez ugyanis erősen függ az atom oxidációs számától. Nagyobb oxidációs szám esetén az él a nagyobb energiák felé tolódik el, hiszen egy nagyobb pozitív töltéssel rendelkező atomon lévő elektron eltávolításához nagyobb energia kell. A vizsgált minta és különböző oxidációs állapotú standard vegyületek abszorpciós élének energiáját (pl. a XANES spektrum első deriváltjának maximuma alapján) megállapítva, a minta oxidációs száma meghatározható. A spektrum

további speciális pozíciói információval szolgálnak a geometriát illetően. Az él előtti csúcson tiltott átmenetnek köszönhető. Ilyen például a  $1s \rightarrow 3d$  átmenet, melyet a kiválasztási szabályok nem engednek meg, a p és d pályák geometriától függő mértékű kombinálódása miatt azonban ez az átmenet is megjelenhet a spektrumban [228]. További jellemző terület a csúcson található váll, mely réz esetén például az axiális ligandum távolságát jellemzi [229]. A XANES spektrometria tulajdonképpen a betöltetlen pályák vizsgálatára alkalmas. Megfelelő referenciavegyületek alkalmazása esetén gyakorlatilag speciációs vizsgálatok végezhetők. Ekkor a minta spektrumát illesztjük a vegyületek spektrumának lineáris kombinációjával [230]. XANES spektrometriával kisebb koncentrációjú minták vizsgálhatók, mint az EXAFS módszerrel.

A röntgenabszorpciós spektrometria során különböző energiájú besugárzást végzünk, ehhez megfelelő intenzitású sugárzás kell (szinkrotronsugárzás) melyből monokromátorral mindig az adott energiáját választjuk ki és végigpásztázunk egy adott energiatartományt. Detektálás több módon történhet, egyrészt hagyományosan, ekkor az áthatolt sugárzást mérjük, ehhez azonban elég nagy koncentrációban kell jelen lennie a vizsgált elemnek a mintában. Másik megoldás az adott elem fluoreszcens sugárzásának mérése [231]. Ekkor azt vizsgáljuk, hogy adott energiájú besugárzásnál mekkora a keletkező fluoreszcens intenzitás nagysága. Nyilván minél nagyobb az abszorbancia, annál nagyobb mértékű lesz a fluoreszcens sugárzás keltése is. A röntgenabszorpciós spektrometria (XAS) ilyen detektálással történő alkalmazása sokkal érzékenyebb vizsgálatot tesz lehetővé.

#### 2.3.3.3. *Biológiai alkalmazások*

A XAS fontos szerkezetkutatói módszer, biológiai minták vizsgálatára is gyakran használják, mind az EXAFS, mind a XANES technikát, sokszor a kettőt együtt alkalmazzák. A következőkben röviden áttekintem az utóbbi évek ezirányú kutatásait, hangsúlyozva a XANES módszerrel kapott eredményeket. Chan és munkatársai a kadmium-tiolát klaszter szerkezetét vizsgálták metallotioneinekben. XAS módszert alkalmaztak (a teljes energiatartományt vizsgálták), különböző modellvegyületeket és metallotioneint vizsgáltak. Modellszámításokat végeztek, melyekhez különböző módszerekkel (NMR, XRD, molekuláris dinamika) kapott koordinátákat használtak. A kísérleti és számított spektrumok jó egyezést mutattak [232]. Montarges-Pelletier és munkatársai három nikkel-hiperakkumulátor növényben vizsgálták a nikkel kémiai környezetét XANES és EXAFS módszerekkel. Gyökér-, szár- és levélmintákat vizsgáltak a cseppfolyós nitrogén hőmérsékletén. A modellvegyületek különböző nikkel-komplexek voltak, melyet vizes oldatokból állítottak elő.

Azt találták, hogy karboxilátok (citrát, malát) a fő nikkelkelátorok [233]. Strub és munkatársai kálium-dikromáttal kezelt fa-mintákban vizsgálták a króm speciációját. A Cr(VI)-nak rendkívül intenzív él előtti csúcs van. A Cr(III)/Cr(VI) arányt lineáris kombinációval határozták meg, a Cr(VI)-hoz tartozó él előtti csúcs nagyságát 100%-nak, a Cr(III)-hoz tartozót 0 %-nak véve. Azt találták, hogy pár héttel a kezelés után is van jelen Cr(VI), hőkezeléssel azonban eltávolítható [234]. Lopez-Moreno és munkatársai szóját kezeltek ZnO és CeO<sub>2</sub> nanorészecskékkel, és ezek átalakulását vizsgálták XANES (Zn K, és Ce L<sub>III</sub> abszorpciós éleknél) módszerrel. A vizsgált mintákat gyorsfagyasztás után liofilizálták és szobahőmérsékleten vizsgálták. Azt találták, hogy a cérium jelen van a növény gyökerében CeO<sub>2</sub>-ként, míg a ZnO átalakul [235]. Lei és munkatársai az arzén oxidációs állapotát vizsgálták hiperakkumulátor növényben XANES spektrometriával. A mintát gyorsfagyasztásnak vetették alá 20 µm vastag metszeteket vágtak belőle, majd liofilizálták. Ezután vettek fel XANES spektrumokat, különböző területekről (szövetekből). Az egyik vizsgált szövetben az As(V) As(III)-má redukálódott, a többiben nem [236]. Zhou és munkatársai cinnabarit (HgS ásvány) bélflórában történő átalakulását vizsgálták. Azt feltételezték, hogy az intesztinális baktériumok képesek metil-higanyt létrehozni, ami sokkal toxikusabb vegyület. Liofilizált mintát vizsgáltak XANES spektrometriával (Hg L<sub>III</sub> és S K abszorpciós éleknél), és megállapították, hogy metil-higany nem keletkezik, de a cinnabarit poliszulfidá alakul [237]. Chwiej és munkatársai Parkinson-kórban szenvedők és egészséges páciensek idegsejtjeiben vizsgálták a réz kémiai környezetét XANES technikát alkalmazva. Liofilizált mintákat elemeztek. Megállapították, hogy a réz nagy része valószínűleg +2-es oxidációs állapotban van jelen tetraéderes környezetben. Nem találtak különbséget a kontroll és a Parkinson-kóros minták között [238]. A korábban említett munkában [179] SR-TXR spektrometriai vizsgálatokat végeztek rákos sejtekben, emellett a vas kémiai környezetét is vizsgálták, ugyanolyan geometriában, XANES vizsgálatot végezve. A sejtminták spektruma a ferritinére emlékeztetett, bizonyos kezelések hatására megváltozott [179]. Misra és munkatársai szivárványos pisztrángok különböző szöveteit vizsgálták, az állatok tápláléka szelenometionint tartalmazott. Liofilizált mintákban vizsgálták a szelén speciációját XANES módszerrel. A minták spektruma minden szövetnél jól illeszthető volt szelenometionin, szelenocisztein és szelenocisztin spektrumának lineáris kombinációjával. Az egyes komponensek súlya eltérő volt a különböző szövetekben [239]. Megfelelően kicsi méretű nyaláb használatával az egyes specieszek térbeli eloszlása is felderíthető, pontonként végighaladva a mintán és minden pontban felvéve a XANES spektrumot. Ennek nagy jelentősége van biológiai minták vizsgálatánál is [240].



## 2.4. Szabadon élő fonálférgek mikroanalitikai vizsgálata

### 2.4.1. Elemtartalom meghatározása

Nyomelemek mennyiségének parazita fonálférgekből való meghatározására sok példa található az irodalomban [241,242]. Ezek az állatok általában jóval nagyobbak, mint a szabadon élők, melyek mikroszkopikusak. A parazita állatok vizsgálata ezért kissé más jellegű analitikai feladat, ezért ennek részletese ismertetésétől eltekintek.

Szabadon élő férgek nyomelem-tartalmának meghatározását is többen elvégezték különböző atomspektrometriai módszerekkel, de a legtöbb esetben a vizsgált minta több egyedből állt. Davydkova és munkatársai különböző tengerben élő állatokat vizsgáltak, köztük szabadon élő fonálférgeket is. A minta egyedszáma az adott állat méretétől függ, de minden esetben legalább kettő volt. Salétromsavas feltárást alkalmaztak (24 óra szobahőmérsékleten, majd melegítés 120 °C-ra), majd FAAS módszerrel határozták meg több elem nedves tömegre vonatkoztatott koncentrációját [243]. Lin és munkatársai mangán *C. elegans*-ra kifejtett hatását vizsgálták. A minták minden esetben 40 állatból álltak, a roncsolás salétromsavval történt 98 °C-on, a mérés ICP-MS módszerrel. Az elemtartalmat egyedszámra vonatkoztatva adják meg. A mangánfelvétel koncentrációfüggést mutat [244]. Helmcke és munkatársai metil-higannyal kezeltek különböző fejlettségi állapotú *C. elegans* férgeket. Nagy mennyiségű egyedből (900, 10.000) álló mintákat vizsgáltak ICP-MS módszerrel, salétromsavas nagy hőmérsékletű feltárást követően. A higanytartalmat fehérjetartalomra vonatkoztatva adták meg. Kezelési koncentrációtól függő elemfelvételt tapasztaltak [245]. Kim és munkatársai ugyanezen faj egyedeit vizsgálták, platina nanorészecskékkel történő kezelés után. A minták 100 egyedből álltak, a roncsolás magas hőmérsékleten történt, több lépésben, különböző savak (HCl, HClO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub>) felhasználásával. A méréshez az ICP-MS technikát használták. Az eredmények megadása ebben az esetben is egyedszámra történt [246]. Li és munkatársai szelénnel kezelt állatokat vizsgáltak, szintén *C. elegans* egyedeket, a minták több egyedből álltak, de az egyedszámról nem tettek említést. Mintaelőkészítésnél nem feltárást végeztek, hanem az állatokat szonikálták, ezáltal a szeléntartalmuk a vizes fázisba került, a felülúszót mérték ICP-AES módszerrel. Az eredményeket fehérjetartalomra vonatkoztatva adták meg [247]. Caito munkatársaival szintén metil-higannyal kezelt *C. elegans* egyedeket vizsgált. A minták nagy mennyiségű állatból álltak (összesen 400.000 darab). A roncsolás HNO<sub>3</sub> és HCl alkalmazásával történt 100 °C-on, a mérés pedig ICP-MS módszerrel. Az eredményeket ng MeHg / g féreg egységben adták meg [248]. Yeo és Nam

TiO<sub>2</sub> nanorészecskékkel és nanocsövekkel kezelt élőlényeket és azok mikrokörnyezetét vizsgálták, többek között *Meloidogyne* fonálférgeket is. Mikrohullámú feltárást alkalmaztak HNO<sub>3</sub> és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> felhasználásával. A minták egyedszámával kapcsolatos információkat nem közölnek. Az eredményeket koncentrációegységben adták meg és bioakkumulációs tényezőt is számoltak. A titán dúsulását állapították meg fonálférgekben (a táplálékukhoz képest) [249]. Howell különböző mintavételi helyekről származó tengeri fonálférgek (*Enoplus brevis* és *Enoplus communis*) réz-, cink-, ólom-, kadmium- és higanytartalmát határozta meg AAS módszerrel. Egyedi mintákat vizsgált, a két említett faj egyedei 5-7 mm hosszúak. A roncsolás salétromsavval történt 200 °C-on. Az állat béltartalmát ultrahangos rázatással távolította el, az eredményeket nedves tömegre vonatkoztatva adta meg [250]. Howell két további közleményét is érdemes megemlíteni, ebben bár nem egyedi mintákat vizsgál, de az elemfelvétel és a toxikus elemek hatásának vizsgálata szempontjából fontosak. Az említett két faj különböző testrészeiben (kutikula, emésztőrendszer, peték, farok és garat) vizsgálta a réz és cink koncentrációját. Az állatok különböző testrészeit eltávolította, nagyobb mennyiségű azonos szervből készített mintákat. A roncsolás és a mérés az előző közleményben leírtaknak megfelelően történt. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy ezen két fajnál a fő elemfelvételi út a kutikula és nem az emésztőrendszer [251]. Egy másik közleményben ismét a két faj egyedeit vizsgálta: réz-, cink- és ólomkezelésnek kitett állatok által kiválasztott nyálka elemtartalmát határozta meg. Kb. 30 állat nyálkáját boroszilikát üvegből készült porral fogta fel, centrifugálta, majd a nyálkát feloldotta ecetsavban, ezután történt az elemzés AAS módszerrel. Tömegmérés nem történt, hanem az oldatból mért elemek koncentrációját vakoldatban mérttel hasonlította össze. A legtöbb esetben a mintában mért koncentráció egy nagyságrenddel nagyobb volt, mint a vakban. A kiválasztott nyálkának tehát fontos szerepe van szennyező elemek megkötésében [252].

#### 2.4.2. Elemeloszlási vizsgálatok

Az EPMA módszert előszeretettel alkalmazzák különböző biomineralizációval képződött objektumok elemösszetételének meghatározására. W. L. Nicholas és munkatársai három mangrove mocsárból származó fonálféreg faj egyedeiben (*Sabatieria wieseri*, *Terschellingia longicaudata*, *Sphaerolaimus papillatus*) vizsgáltak intracelluláris zárványokat. A mintát glutáraldehiddel fixálták, vízzel mosták, majd áthelyezték különböző folyadékokba a következő sorrendben: etanol, propilén-oxid, Spurr gyanta. SEM és TEM vizsgálatokat is végeztek, mindkét esetben 5 µm vastag metszeteket készítettek. A következő elemek jelenlétét figyelték meg a zárványokban: Si, P, S, K, Ca, Fe, Na, Zn, Al [253]. Cranfield és

munkatársai *C. elegans*-ban vizsgálták az elektromágneses tér hatására keletkező szemcséket. A mintát TEM módszerrel vizsgálták, a kis részecskék látszottak a képen, ezeket vizsgálták tovább elektron energiaveszteségi spektrometriával (EELS). A kristályok 2-3 nm méretűek, csak vasat és oxigént tartalmaznak. Egy további fizikai vizsgálat eredménye alapján, a kristály magnetit [254]. Williams és Seraphin talajlakó *Panagrolaimus superbis* fonálférgeket vizsgált TEM és EPMA módszerrel. Ólom-acetáttal kezelt és kontroll állatokat analizáltak. Az állatokat vizes öblítés után 2% pH=7-re pufferolt glutáraldehidbe tették 24 óráig, majd alkohollal dehidratálták és Spurr gyantába ágyazták őket. A nyelőcső régióban kristályokat figyeltek meg, nagy ólom-, foszfor- és kén tartalommal [255].

Gyakran használt módszer az SXRF technika, mely megfelelően kicsi méretű nyalábokat alkalmazva lehetővé teszi nagyfelbontású elem térképek készítését. Jackson és munkatársai *C. elegans*-ban figyeltek meg ólomkezelés után fellépő biomineralizációt. Az ólom mellett rézzel kezelt állatokat is vizsgáltak. Az állatokat Kapton szalagon rögzítették agar gélben. A nyalábméret 10  $\mu\text{m}$  \* 10  $\mu\text{m}$  volt, a mérési idő képpontonként 2 és 10 s közötti. A réz esetén homogén eloszlást figyeltek meg, míg az ólom szinte kizárólag az elülső garati régióban lokalizálódott. Mikro-XRD módszer segítségével megállapították, hogy az ólom piromorfit-kristályként van jelen [256]. Gao és munkatársai réz nanorészecskékkel és  $\text{CuCl}_2$ -oldattal kezelt *C. elegans* egyedekben vizsgálták a réz és esszenciális elemek eloszlását. Az állatokat polikarbonát filmre helyezték, majd gyorsfagyasztást végeztek folyékony nitrogénben, a tárolás és a mérés is szobahőmérsékleten történt. Az alkalmazott nyalábméret 3  $\mu\text{m}$  \* 5  $\mu\text{m}$ , a képpontonkénti mérési idő 10 s volt. A réz koncentrációját azonosan kezelt állatokból meghatározták ICP-MS módszerrel. Az oldatos kezelés a réztartalom nagyobb növekedéséhez vezetett. Nanorészecskékkel történő kezelés esetén a fejben, oldatos esetén a kiválasztó sejtekben és a bélben találtak jelentősebb dúsulást. A kezelések megváltoztatták esszenciális elemek eloszlását is [257]. James és munkatársai *C. elegans*-ban található esszenciális elemek kétdimenziós eloszlását vizsgálták. Az alkalmazott nyaláb 2  $\mu\text{m}$  átmérőjű volt, egy képpontot 7 ms-ig mértek. Vizsgáltak mintaelőkészítés nélküli (hidratált) és gyorsfagyasztás után liofilizált (dehidratált) mintákat. Megállapították, hogy a hidratált minta sugárkárosodása nem jelentős. A mért elemeloszlásokban nem tapasztaltak jelentős különbséget a hidratált és dehidratált minták közt [258].

Nagyfelbontású háromdimenziós elemeloszlási térképek készíthetők mind EPMA, mind SXRF módszerrel kezeletlen állatról is. McColl és munkatársai *C. elegans* egyedeket vizsgáltak SXRF tomográfiával. Az állatot szilícium-nitrid mintahordozóra tették, kiegyenesítették, lefagyasztották folyékony nitrogénben lévő folyékony propánban, majd liofilizálták. Ezután

fóliával bevonták, majd 1,5  $\mu\text{m}$  átmérőjű nyalábbal vizsgálták, a képpontonkénti mérési idő 3 ms volt [259]. Leapman és munkatársai ugyanezt az állatot vizsgálták TEM segítségével, EELS detektálást alkalmazva. A mintát először nagy nyomáson fagyasztották. Ezután ún. fagyasztásos szubsztitúciót végeztek 0,2% etilén-glikol-bisz-szukcinimidil-szukcinátot tartalmazó acetonnal. Folyamatos melegítést követően (szobahőmérsékletig) a mintát polimerbe ágyazták, majd 70 nm vastag metszeteket készítettek. A foszfor háromdimenziós eloszlását vizsgálták, nagy foszfortartalmú objektumokat találtak, melyek a riboszómáknak felelhetnek meg [260].

### 2.4.3. Speciációs vizsgálatok

Howell és Smith a [251]-ben bemutatott módon végezte az *Enoplus brevis* egyedeiből a különböző szervek szétválasztását. Kadmium megkötődését vizsgálták kadmium-kloriddal kezelt állatban. Az egyes szervek kadmiumtartalmát AAS módszerrel, a kadmium kötődését  $^{109}\text{Cd}$  aktivitásának mérésével és gélelektroforézissel határozták meg. Kadmiumtartalmú tengervízzel történő kezelés esetén a felvétel főleg a kutikulán át történt, míg amikor az üledékben volt kadmium, az emésztőrendszer volt a főszereplő az elemfelvételben. A kadmium a kutikulában egy 450.000 g/mol, az epidermiszben és az izomrétegben egy 28.000 g/mol, míg a bélrendszerben egy 200.000 g/mol moláris tömegű fehérjéhez kötődik tengervízzel történő kezelés esetén. Üledékkel történő kezelés során a bélrendszerben figyeltek meg kötődést, ugyanahhoz a fehérjéhez, mint tengervizes kezelés esetén [261].

Zeitoun-Ghandour és munkatársai a cink és kadmium kémiai környezetét és metallotioneinekhez való kötődési képességét határozták meg. A kutatás során XANES és EXAFS spektrometria méréseket is végeztek. A mintaelőkészítés során nagy mennyiségű fonálférget (több ezret) finom porrá őrölték folyékony nitrogénben, majd  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolták, a mérés is alacsony hőmérsékleten történt (kb. 20 K), a kadmium és a cink K abszorpciós élénél. A standard vegyületeket elporították, majd bór-nitriddel hígították. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a kémiaileg hasonló, de biológiai szempontból jelentősen eltérő cink (esszenciális) és kadmium (toxikus) kémiai környezete eltérő. A cink első koordinációs szférájában 4 oxigénatom van, XANES spektruma pedig a  $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ -ra hasonlít leginkább. A cink elsősorban foszfortartalmú ligandumokhoz kötődik, a kadmium viszont tiolcsoportokkal koordinálódik [262]. Qu és munkatársai félvezető nanorészecskék, ún. kvantumpöttyök ( $\text{CdSE@ZnS}$ ) felvételét eloszlását és kémiai környezetét vizsgálták *C. elegans*ban. A vizsgálatokhoz szinkrotronsugárzást is használták. A mintákat Mylar fóliára helyezték, majd folyékony nitrogénnel fixálták. Az alkalmazott nyalábméret  $5\text{ }\mu\text{m} * 5\text{ }\mu\text{m}$  volt, mind az

elemeloszlási, mind a XANES vizsgálatoknál. Megállapították, hogy az elemeloszlási vizsgálatokhoz előnyösebb az SXRF, mint a fluoreszcens jelzés, mert ha a kezelőanyag kémiai formája megváltozik az állatban, akkor már nem biztos, hogy mérhető fluoreszcencia, míg az elem röntgenfluoreszcens jele természetesen detektálható. A kvantumpöttyök a bélrendszerben dúsulnak, és az ottani savas környezetnek köszönhetően a ZnS kéreg lebomlik és a  $\text{Se}^{2-}$   $\text{SeO}_3^{2-}$ -tá oxidálódik [263].

### 3. Célkritizálás

Az irodalmi áttekintés alapján nyilvánvaló, hogy a talajszennyezés a 21. egyik komoly környezeti problémája. A talajszennyezésnek komoly egészségügyi vonatkozásai vannak, ezek tanulmányozása kiemelkedő fontosságú. A fonálférgek, mint modellszervezetek hasznosak lehetnek ezekben a vizsgálatokban. Az irodalmat áttekintve azonban azt tapasztaljuk, hogy a talajszennyezéssel kapcsolatos egyedszintű vizsgálattal foglalkozó közlemények száma meglehetősen kicsi. Manapság rendelkezésünkre állnak modern analitikai és szerkezetkutató módszerek, melyek segítségével mikro- és nyomelemek mennyisége, eloszlása és speciációja meghatározható meglehetősen kicsi mintákból is. Ezek alapján célul tűztam ki, hogy egy Európában gyakori növényevő fonálféreg (*Xiphinema vuittenezi*) faj egyedeinek vizsgálatára alkalmas mikroanalitikai módszereket fejlesszek, melyek felhasználhatók a fent említett feladatokra.

Munkám során három talajszennyező mikroelem (réz, króm, cink) hatását kívántam vizsgálni, mesterséges kezeléseknek kitett állatokban. Különböző réz- és krómtartalmú vizes oldatokkal történt a kezelés, a cink esetén a nano ZnO-szuszpenzió hatásának vizsgálata volt az elsődleges cél, összehasonlító vizsgálatként bizonyos esetekben nagyszemcsés ZnO-dal és cinktartalmú vizes oldatokkal is történtek kezelések. Nanorészecskékkel történő kutatások esetén rendkívül fontos az adott rendszer vizsgálata különböző fizikai és kémiai módszerekkel, hiszen a biológiai hatást számos tényező befolyásolja (a részecskék mérete, alakja, kristályszerkezete, az ionos formában jelenlévő fém mennyisége). Ezért célul tűztam ki a kezelésekhez használt nano és nagyszemcsés ZnO és a belőlük készült szuszpenziók vizsgálatát különböző módszerekkel: EPMA, XRD, XANES, SEM, STEM, dinamikus fényszóródás mérés (az utolsó három szuszpenzió esetén), TXRF spektrometria (szuszpenzió esetén, oldott cink mennyiségének meghatározására).

Céлом volt egy TXRF spektrometriai módszer fejlesztése, melynek segítségével egyedi fonálféreg-minták mikro- és nyomelemtartalma mérhető. A kifejlesztett módszerrel a réz-,

króm- és nano ZnO-szennyezésnek az állat mikro- és nyomelemtartalmára kifejtett hatását kívántam vizsgálni. A kezeléshez használt elemek mennyiségének meghatározása, mint cél nyilvánvaló, de a szennyező elemek felvétele hatással lehet az esszenciális elemek mennyiségére, így azok koncentrációjának meghatározása is célszerű. Azt kívántam vizsgálni, hogy a mesterséges kezelések paraméterei (pl. kezelési koncentráció, idő) hogyan befolyásolják az elemfelvételt és az esszenciális elemek mennyiségét.

Célul tűztem ki egy megfelelő mintaelőkészítési módszer kifejlesztését, mellyel a fonálféreg-minták vizsgálhatók extrém körülmények között (nagyvákuum, nagyintenzitású sugárzással történő vizsgálat). A liofilizálást megfelelő módszernek tartom, alkalmazhatóságának vizsgálata is célom volt. A megfelelően előkészített, fent említett kezeléseknél kitett állatokban kívántam vizsgálni a kezeléssel bevitt elemek (réz, króm, cink) és az esszenciális foszfor és kén eloszlását EPMA módszerrel. Réz esetén a szájszerv, a fej és a kutikula elemfelvételben betöltött szerepét vizsgáltam, egy- és kétdimenziós elemeloszlások meghatározásával. A FIB technika alkalmazásával keresztmetszeteket készítettem az állatok különböző testtájain, majd ezekben végeztem elemeloszlási vizsgálatokat, előre definiált vonalak mentén. Ebben az esetben mindhárom talajszennyező elem esetén elvégeztem a méréseket.

További célom volt a fent említett módon előkészített mintákban két kezeléshez használt talajszennyező mikroelem (réz, cink) kémiai környezetének vizsgálata XANES spektrometria segítségével.

## 4. Kísérleti rész

### 4.1. Mintavétel és előzetes vizsgálatok

#### 4.1.1. Mintavétel

Vizsgálataim során minden esetben a *Xiphinema vuittenezi* faj nőtény egyedeit vizsgáltam. A talajmintavétel Hűvösvölgyben történt barna erdőtalajból, 20-40 cm mélységben, egy cseresznyefa (*Prunus cerasus* L.) gyökerének közelében. A talajmintákat hűtőben tárolták, vagy egyből felhasználásra kerültek. Az állatok kinyerése a talajból módosított Cobb-módszerrel történt, különböző pórusméretű sziták felhasználásával [264]. A talajból történő kinyerést a Szent István Egyetem Állattani és Állatökológiai Tanszékének munkatársai végezték.

#### 4.1.2. A béltartalom eltávolíthatóságának vizsgálata

A szükséges éheztetési idő megállapítása érdekében fénymikroszkópos vizsgálatokat végeztem (Nikon Eclipse LV100 POL fénymikroszkóp, Tokio, Japán). Néhány állatot csapvízben tároltam 1 napig, majd felvételeket készítettem. Ezután további 4 napig folytattam az éheztetést. A továbbiakban 5 napig tartó éheztetést végeztünk minden esetben a kezelések megkezdése, illetve kezeletlen állat esetén a mintafelvétel kezdete előtt.

#### 4.1.3. Az állatok biomasszájának vizsgálata

Mivel a kísérletek megkezdésekor semmilyen információval nem rendelkezttem az állatok kémiai összetételét illetően, fontosnak tartottam, hogy biomasszájuk vizsgálata érdekében a szén- és nitrogéntartalmukat meghatározzam. A vizsgált faj egyedeinek nedves tömege rendkívül csekély (néhány  $\mu\text{g}$ ), ezért ennek mérése komoly nehézségekkel jár. Ezért az állatok tömegét becsléssel határoztam meg, ez a később ismertetésre kerülő TXRF és ICP-MS vizsgálatoknál is így történt. A tömeg meghatározásához mikroszkóp segítségével fényképet készítettem az állatokról, majd megmérve a testhosszukat és legnagyobb testátmérőjüket kiszámoltam a nedves tömeget a következő formula felhasználásával [264]:

$$W=(L*D^2)/(1,6*10^6) \quad (2)$$

Ahol  $W$  az állat tömege  $\mu\text{g}$ -ban,  $L$  a hosszúság,  $D$  a legnagyobb testátmérő, utóbbi két mennyiség  $\mu\text{m}$ -ben szerepel. A mérésekhez ImageJ szoftvert használtam.

Az állatok átlagos száraz tömegét is meghatároztam mikromérleg segítségével. Ebben az esetben 30 vagy 35 állatot tettem kvarcpapírra, majd szárítottam őket  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 20 percig. A

méréseket Mettler (Mettler Toledo Kft., Budapest) mikromérleggel végeztem, három mintát vizsgáltam.

A szén- és nitrogéntartalom meghatározásához 25 állatot helyeztem kvarcpapírra fémtű segítségével, majd szárítottam őket 105 °C-on 20 percig. A kvarcpapírt ezután kvarccsónakba helyeztem, majd elvégeztem a mérést Multi N/C Jena 2100 típusú szén- és nitrogénanalizátorral (Analytik Jena, Németország). A készülék kalibrálását kálium-hidrogén-ftaláttal (széntartalom) és kálium-nitrát és ammónium-szulfát keverékével (nitrogéntartalom) végzik. Összesen 5 mintát vizsgáltam.

## **4.2. Az állatok kezelése**

Az állatok kezelésére különböző összetételű vizes oldatokat és szuszpenziókat használtam, ezek összetételét és a kezelési időt külön-külön ismertetem az adott kísérleteknél. Az oldatokat frissen készítettem az adott vizsgálatok előtt, előre elkészített törzsoldatok hígításával. Az oldatok készítéséhez Milli-Q vizet használtam. A felhasznált vegyszereket ( $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ) a Reanal Laborvegyszer Kft.-től (Budapest) rendeltem. A TXRF vizsgálatoknál a rezes és krómos kezelések esetén a megadott koncentráció névleges koncentráció. Ebben az esetben kétszeres koncentrációjú oldatokat készítettem, és azonos térfogatú talajoldattal (általában 200  $\mu\text{l}$ ) hígítottam azokat. A talajoldatot kb. 500 g (a fonálférgek kigyűjtéséhez használttal azonos helyről származó) talajból készítettem centrifugálással (30 perc, 14.000 fordulat/perc, Janetzki T24 centrifuga, Lipcse, Németország). Szuszpenziókat készítettem nano és nagyszemcsés ZnO-ból (Sigma-Aldrich Kft., Budapest) Milli-Q víz felhasználásával. A specifikáció szerint a nano ZnO 50 nm-nél kisebb részecskéket tartalmaz, és százalékos mennyiségben tartalmaz alumíniumot. Először 500 mg/L koncentrációjú törzssuszpenziót készítettem, majd ebből készítettem el frissen a kezelésekhöz használt hígabb szuszpenziókat. A hígítás és a kezelés előtt is ultrahangos rázatást végeztem (30 perc, 37 kHz, 560 W, Elmasonic S40, Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Németország).

### **4.2.1. Nagyszemcsés és nano ZnO vizsgálata fizikai és kémiai módszerekkel**

#### *4.2.1.1. Kémiai összetétel vizsgálata EPMA módszerrel*

A nagyszemcsés és nano ZnO elemösszetételét a később bemutatásra kerülő FEI Quanta 3D pásztázó elektronmikroszkóppal végeztem. Kis mennyiségű port vittem fel alumínium



mintatartóra rögzített Carbon Adhesive Tape kétoldalú ragasztó (SPI Supplies, West Chester, USA) hordozóra. A vizsgálatokat 100 másodpercig végeztem ( $U=20$  kV,  $I=3,8$  nA).

#### *4.2.1.2. Kristályszerkezet meghatározása XRD módszerrel*

A nano és nagyszemcsés ZnO kristályszerkezetét Siemens D5000 típusú pordiffraktométerrel határoztuk meg. A mérések szobahőmérsékleten történtek,  $0,05^\circ 2\theta$  lépésközzel, lépésenként 2 s mérési idővel.

#### *4.2.1.3. A részecskék méretének és morfológiájának vizsgálata a szuszpenziókban*

50 mg/l koncentrációjú szuszpenziók 30 perces ultrahangos rázatás utáni vizsgálatát végeztem a FEI Quanta 3D készülékkel. SEM és STEM vizsgálatot is végeztem, előbbi esetben 1, utóbbiban 2,5  $\mu$ l mintát vittem fel a hordozóra, mely nagy orientációjú pirolitikus grafit (HOPG), illetve rézrács mintahordozó volt. A SEM vizsgálatokhoz ETD-detektort (Everhart-Thornley detektor), a pásztázó transzmissziós vizsgálatokhoz a készülék STEM detektorát használtuk.

#### *4.2.1.4. Nano ZnO-szuszpenzió részecskeméret-eloszlásának vizsgálata*

A részecskeméret-eloszlás meghatározása érdekében a nano ZnO-szuszpenziót dinamikus fényszóródási mérésekkel vizsgáltam. A törzsszuszpenzióból 30 perces ultrahangos rázatást követően 100  $\mu$ l-t kivettem, majd 10 ml Milli-Q vizet tartalmazó centrifugacsőbe pipettáztam. Az így kapott minta vizsgálatát egy Brookhaven Instruments (USA) eszközzel határoztuk meg, mely egy BI-200SM goniométert és egy BI-9000AT digitális autokorrelátort tartalmaz. Fényforrásként Lixel 95 model 2 vízhűtött argonion-lézert alkalmaztunk, a mérési hullámhossz 488 nm volt. Az autokorrelációs függvényeket  $90^\circ$ -os szögnél 218 csatornában mértük 100  $\mu$ m lyukmérettel, analizálásuk a CONTIN módszerrel történt. A mintát másfél óras állás után újra megmértük, ezen idő alatt semmilyen mozgatsáknak nem tettük ki.

#### *4.2.1.5. Oldott cink mennyiségének meghatározása szuszpenziókból TXRF módszerrel*

Az oldott ZnO mennyiségének koncentrációtól, pH-tól és részecskemérettől való függését TXRF spektrometriai módszerrel vizsgáltam. A frissen készített, 30 perces ultrahangos rázatásnak kitett oldatok pH-ját beállítottam (pH=5,5; 6,3; 7,0) híg  $\text{HNO}_3$ - (suprapur, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) és NaOH-oldatok (szilárdból készítve, Merck) segítségével. 24 óra várakozást követően 1,5 ml-t vettem ki a szuszpenziókból, az így kapott mintákat Eppendorf edényekben centrifugáltam HERMLE Z233 MK-2 típusú (Hermle Labortechnik

GmbH, Wehingen, Németország) ultracentrifugával 20 percig (20 °C, 13.000 g). Ezután a felülúszóból 1 ml-t pipettáztam ki és 100 µl 10 mg/L koncentrációjú Ga belső standard-et (Gallium ICP standard, Merck) adtam hozzá. A TXRF mintahordozóra 5 µl mintát vittem fel, majd főzőlapon szárítottam 90 °C-on 10 percig. A mintahordozók és a mérési körülmények a később ismertetésre kerülő, fonálférgek vizsgálatára használt módszernél alkalmazottal azonosak voltak.

### **4.3. TXRF spektrometriai vizsgálatok**

TXRF spektrometriai vizsgálataim során mindig kvarc mintahordozó lapokat használtam. A mintafelvétel előtt minden esetben megtisztítottam a lapokat. A lapokat Milli-Q vízzel öblítettem, majd anionos detergens (Micro liquid laboratory cleaner, Cole-parmer Instrument Company, Niles, USA) 2 %-os oldatában forraltam 20 percig, majd öblítés után 1:3 suprapur HNO<sub>3</sub>-oldatban, szintén 20 percig. Ezután a lapokat főzőlapon szárítottam, majd tisztaságvizsgálatot végeztem TXRF módszerrel.

#### **4.3.1. Módszerfejlesztés**

A kezelésnek nem kitett fonálférgeket (a tömeg becsléséhez szükséges fotó elkészítése után) egy percig öblítettem, majd kvarc TXRF mintahordozó közepére helyeztem őket, egy lapra egy állat került. Az állatokkal történő összes manipulációhoz egy hegyes végű műanyag eszközt használtam az összes továbbiakban bemutatásra kerülő vizsgálat esetén. Az állatokat 5 ng gallium belső standard-et tartalmazó 5 µl cc. suprapur HNO<sub>3</sub>-oldattal roncsoltam. A mintákat főzőlapon melegítettem 10 percig (90 °C), mikro- és nyomelem-tartalmukat ATOMIKA 8030C TXRF spektrométerrel (ATOMIKA Instruments GmbH, Németország) határoztam meg. A készülék a bécsi TU-Wien Atominstitut-ban található, ott végeztem a méréseket, Mo K $\alpha$  gerjesztést (50 kV, 47 mA), Zr20 szűrőt és 500 s mérési időt (live time) alkalmazva.

#### *4.3.1.1. A szerves mátrix eltávolíthatóságának vizsgálata*

Az előző fejezetben leírtaknak megfelelően elkészített mintából vizsgáltam hármat, majd a spektrumok felvétele után további roncsolást végeztem hideg oxigénplazmás hamvasztó berendezéssel (Plasma Barrel Etcher PT7150, Biorad Laboratoric GmbH, München, Németország, 250 W, visszavert teljesítmény 5 W). A roncsolás két óráig tartott, ezután újabb mérés következett, majd megismételtem a roncsolást ugyanilyen paraméterekkel és ismét megmértem a mintákat. A spektrumokban 3 elemre (Cu, Zn, Ga) meghatároztam a jel-háttér arányokat. A további vizsgálatok során mindig 2 órás hamvasztást alkalmaztam.

#### *4.3.1.2. Összehasonlítás ICP-MS mérésekkel*

A kezeletlen állat mikro- és nyomelemtartalmát 11 mintából határoztam meg a fent leírt TXRF módszerrel. Hitelesített referenciaanyag hiányában a módszer megbízhatóságát más fizikai elven működő analitikai módszerrel történő vizsgálattal lehet ellenőrizni. Ebből a célból ICP-MS vizsgálatokat végeztem. Három mintát készítettem, mindegyik 100 állatot tartalmazott. Az állatokat kicsi kvarckémcsőbe helyeztem, majd 100 µL cc. HNO<sub>3</sub>-oldatot adtam hozzájuk. A kémcsövet üvegháromlábba helyeztem, azt pedig teflon bombába, mely további 4 mL cc. HNO<sub>3</sub>-oldatot és 1 mL 30 %-os suprapur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot (Suprapur, Merck) tartalmazott. Minden bombába egy kémcső került. Roncsolást végeztem nyomás- és hőmérséklet-kontrollált mikrohullámú roncsoló berendezésben (Ethos 1, Milestone S.r.l., Milánó, Olaszország), a három mintán és egy vak, csak a feltáráshoz használt vegyszereket tartalmazó mintán egyszerre. A következő hőmérséklet-programot alkalmaztam: 500 W, 3 perc; 600 W, 20 perc; 30 perc hűtés. A mintákhoz 50 µL cc. suprapur HNO<sub>3</sub>-oldatot és 250 ng Ga belső standard-et adtam, majd térfogatukat 5 mL-re egészítettem ki. Ezután ICP-MS méréseket végeztem kutatócsoportunk Thermo Element 2 kettős fókuszálású ICP-MS berendezésével (Thermo FisherScientific), melynek paramétereit a 4.1. táblázatban tüntettem fel.

Rádiófrekvenciás teljesítmény	1200 W
Külső gáz áramlási sebessége	16 L/perc
Közbülső gáz áramlási sebessége	0,85 L/perc
Aeroszol-vivőgáz áramlási sebessége	1,1 L/perc
Porlasztó egység	Meinhard-féle koncentrikus porlasztó Scott-féle ködkamrával
Sampler kónusz	Ni, 1 mm átmérőjű furat
Skimmer kónusz	Ni, 0,7 mm átmérőjű furat
Üzem mód	Peak jumping
Tartózkodási idő (dwell time)	0,1 s
Felbontás	4000
Analitikai izotópok	<sup>44</sup> Ca, <sup>55</sup> Mn, <sup>57</sup> Fe, <sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn, <sup>69</sup> Ga

4.1. táblázat: Az ICP-MS mérés paraméterei

#### 4.3.2. Kezelt állatok TXRF spektrometriai vizsgálata

##### 4.3.2.1. A minták tisztítása kezelés után

A vizsgálatok során nyilván az állat által felvett és megkötött kezelőszer mennyiségére vagyunk kíváncsiak, ezért fontos az állat felszínén megkötődött anyag eltávolítása. Ennek vizsgálata érdekében analizáltam olyan mintákat, melyek a kezelőszerből kivett és közvetlenül a lapra helyezett állatokból álltak, illetve olyanokat is, melyeket a kivétel után 1 percig Milli-Q vízben mostam. A következő kezeléseket végeztem: 5 mmol/L és 200 mmol/L KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-oldat, 5 mg/L és 50 mg/L nagyszemcsés és nano ZnO-szuszpenzió, 24 óra kezelési idő minden esetben. A továbbiakban minden kezelés után alkalmaztam öblítést. Minden kezelt állat TXRF vizsgálata során egy adott kezelés esetén általában 5 (bizonyos esetekben 4) azonos kezelésnek kitett mintát vizsgáltam. A mérési eredmények megadásánál minden esetben legalább 3 mérés eredményét használtam fel. A különbség oka a minták viszonylag gyakori szennyeződése vagy mintahordozóról történő leesése a szállítás során.

##### 4.3.2.2. Élő állatok kezelése

Az állatok kezelését mikrotiter-lapokban végeztük, egy vájatba téve a kezelőszert és általában 5 állatot. A kezelések – ahol nem jelzem külön – 24 óráig tartottak. Ezután 1 perces öblítés következett, a mintaelőkészítés és a mérés a korábban leírtaknak megfelelően történt.

A következő koncentrációtartományokban végeztem a kezeléseket:  $\text{CuSO}_4$ -oldat 1  $\mu\text{mol/L}$  - 10  $\text{mmol/L}$ ;  $\text{K}_2\text{Cr}(\text{SO}_4)_2$ -oldat és  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ -oldat: 100  $\mu\text{mol/L}$  - 250  $\text{mmol/L}$ ; nagyszemcsés és nano  $\text{ZnO}$ -szuszpenzió és  $\text{ZnSO}_4$ -oldat: 5  $\text{mg/L}$  - 250  $\text{mg/L}$ . A cinkkel történő kezelések esetén talajoldatot nem alkalmaztam, a többi esetben igen. Réz esetén elvégeztem a felvétel időfüggésének vizsgálatát is. Három különböző koncentrációt (12,5  $\mu\text{mol/L}$ , 250  $\mu\text{mol/L}$ , 5  $\text{mmol/L}$ ) és 6 kezelési időt (1, 3, 6, 24, 48, 120 óra) alkalmaztam.

#### *4.3.2.3. Előzetesen elpusztított állatok kezelése*

Az elemfelvételben szerepet játszó passzív folyamatok tisztázása érdekében előzetesen elpusztított állatokat is vizsgáltam. Ekkor minden tekintetben úgy jártunk el, mint élő állatok esetén, azzal a különbséggel, hogy elpusztított állatokat kezeltünk. A kezelési idő 24 óra volt minden esetben. A fonálférgeket – ahol nem jelzem külön – rövid ideig tartó melegítéssel öltük meg. A következő kezeléseket alkalmaztuk: 10  $\text{mmol/L}$   $\text{CuSO}_4$ -oldat, 50  $\text{mmol/L}$   $\text{K}_2\text{Cr}(\text{SO}_4)_2$ - és  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ -oldat, 50  $\text{mg/L}$  nagyszemcsés és nano  $\text{ZnO}$ -szuszpenzió.  $\text{CuSO}_4$ -oldattal történő kezelés esetén a különböző elpusztítások hatását is vizsgáltam. Ekkor az említettel azonos kezelést végeztünk azzal a különbséggel, hogy az ölés más módokon történt. Egyrészt meleg formaldehid-oldattal (4%-os, Reanal Laborvegyszer Kft., vízzel kb. 1:1 arányban hígítva), másrészt 1  $\text{mol/L}$  koncentrációjú  $\text{CuSO}_4$ -oldattal. Utóbbi esetben az állatokat rögtön elpusztulásuk után (kb. 10 perc) eltávolítottuk az oldatból. Ennél a kezelésnél azt is vizsgáltuk, hogy mennyi rezet vesz fel az állat a haláláig a nagy töménységű oldatból, ezért 5 állatot további kezelés nélkül is vizsgáltunk.

## **4.4. Elektronmikroszkópos vizsgálatok**

### **4.4.1. Mintaelőkészítés**

Az állatokat kezelésük után egy percre öblítettem Milli-Q vízben. Ezután Carbon adhesive tape hordozóra helyeztem őket, melyet előzetesen alumínium mintatartóra rögzítettem. A mintahordozókat műanyag edénybe helyeztem, majd lezárva azt, folyékony nitrogénbe mártottam két percre. Ezt követően a mintákat liofilizáltam 72 óráig HETO DRYWINNER készülék (Cambridge Biosystems Ltd., Cambridge, Egyesült Királyság) segítségével. A vizsgálatok megkezdéséig a mintákat zárt műanyag edényben tároltam. A liofilizálás, mint mintaelőkészítési módszer szükségességének vizsgálata érdekében készítettem egy mintát, melyet ugyanolyan hordozón rögzítettem, de nem liofilizáltam. Az így készített mintát elektron- és ionnyalábbal sugároztam be.

#### 4.4.2. EPMA vizsgálatok

Az összes SEM, EPMA és FIB vizsgálatot nagyvákuumban ( $3,5 \cdot 10^{-4}$  Pa) végeztem a FEI Quanta 3D készülék (FEI Company, Hillsboro, USA) segítségével. A készülék az ELTE Anyagfizikai Tanszékén található. A vizsgált mintákban különböző helyekről vettem fel röntgenspektrumokat, általában 20 kV gyorsító feszültséget, 1,9 nA elektron-áramerősséget és 100s mérési időt (live time) használva. A röntgenspektrumok felvétele a készülékbe épített energia-diszperzív SDD segítségével történt. A réz hosszirányú eloszlásának tanulmányozása érdekében egy 1 mmol/L  $\text{CuSO}_4$ -oldattal 24 óráig kezelt állatról spektrumokat gyűjtöttem  $225 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  területekről. Tíz mérést végeztem az állat testhossza mentén. Figyelembe véve a faj egyedeinek hosszát (kb. 3 mm) az állat testfelszínének jelentős részét lefedi a vizsgált tartomány. Minden mérési pontban egy mérést végeztünk, a megadott szórást a készülék szoftvere számolta az adott mérésekre. Ezen állat feji részéről elemtérképeket is készítettem (20 kV, 430 pA, 2 s tartózkodási idő,  $64 \times 50$  mérési pont).

#### 4.4.3. Metszetek készítése FIB technikával

Liofilizált fonálféreg-mintákon végeztem bemetszéseket a berendezés FIB-egysége segítségével. Az egység Ga-ionokat gyorsít, és ezzel bombázható a minta. A bemetszéseket az állat testközepe környékén végeztem a következő módon kezelt állatok esetén: 1 mmol/L  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -oldat, 50 mmol/L  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ -oldat, 50 mg/L nano ZnO-szuszpenzió, 24 órás kezelés minden esetben. A rézzel kezelt állat esetén végeztünk bemetszést a farok közelében is (az állat farkának eltávolításával). A vágás előtt platínával vontunk be egy kisebb felületet, azért hogy megvédjük a készítenő keresztmetszet felső rétegeit a sérüléstől. Először egy nagyon vékony réteget (kb. 100 nm) raktunk le elektronok segítségével, annak érdekében, hogy a minta felszín egyáltalán ne sérüljön, és hogy elkerüljük a jelentősebb mértékű galliumszennyezést. Ezután a réteg lerakását ionnyalábbal folytattuk, mert ez jóval kevesebb időt vesz igénybe. A platinaréteg vastagsága általában  $1 \mu\text{m}$ , szélessége  $2 \mu\text{m}$ , hossza kb.  $50 \mu\text{m}$  volt, utóbbi pontos értéke az adott féreg szélességétől függött. Először ún. regular cross-section ablációt alkalmaztunk (30 kV, 15 nA). Ezután tisztításként ún. cleaning cross-section ablációkat kisebb áramokkal (általában 1 nA és 3 nA, az előzővel azonos gyorsító feszültség). Így nagyon sima keresztmetszeteket tudtunk létrehozni. A készülékben az elektron- és az ionnyaláb  $52^\circ$ -os szöget zár be egymással. Függőleges keresztmetszetek létrehozása érdekében a mintatartót ugyanilyen szöggel kell elforgatni. A metszetkészítés összesen kb. 2 órát vesz igénybe.

#### **4.4.4. Elemeloszlási vizsgálatok a keresztmetszetekben**

A keresztmetszeti elemeloszlások vizsgálata érdekében egydimenziós analíziseket végeztünk előre definiált vonalak mentén. A vonalak 75 vagy 150 pontból álltak. A tartózkodási idő 5 s volt, ezt és a kezelési koncentrációkat korábbi TXRF mérések eredményei alapján választottuk. Keresztmetszetenként 3-5 vonalat vizsgáltunk, ezekben az elemeloszlások hasonlítottak egymásra, ezért csak egyet-egyet mutatok be belőlük.

#### **4.4.5. Adatfeldolgozás**

Minden spektrum, elemtérkép és egydimenziós eloszlás felvételét a Genesis szoftver irányításával végeztük. Az eredeti elemtérképek színét pirosra, zöldre és kékre változtattam (szintén a szoftver segítségével) korrelációs elemtérképek létrehozása érdekében. Ezeket ImageJ szoftverrel készítettem összeadva két vagy három képet a „Merge channels” parancs segítségével. Az egydimenziós eloszlások esetén a mért intenzitásokat normáltam (minden értéket osztottam az adott elem eloszlása során mért maximális intenzitás értékével), azok könnyebb grafikus összehasonlíthatósága érdekében. Foszfor esetén az első és utolsó néhány pontot töröltem, mert a minta itt szinte csak platinát tartalmazott. Ennek M-vonala átfed a foszfor K-vonalával, így a maximum foszforintenzitások erről a helyről származtak volna, ez pedig torzítja az elemeloszlási képet. A keresztmetszetekben végzett elemeloszlási vizsgálatok során a grafikonokon függőleges eltolást alkalmaztam az egyes elemek eloszlásának ábrázolásakor, a jobb áttekinthetőség érdekében. Ezenkívül korrelációs számítást is végeztem az adott kezeléshez használt elem (Cu, Cr, Zn) és két EPMA módszerrel jól mérhető esszenciális elem (P, S) eloszlása közt.

### **4.5. XANES vizsgálatok**

#### **4.5.1. Mérőhelyek**

Szinkrotronos vizsgálatokat végeztem 2011 januárja és 2013 februárja között 4 alkalommal a Helmholtz Zentrum Berlin BESSY II szinkrotronján. A BESSY II egy 1998 óta működő, 1,7 GeV energiájú harmadik generációs szinkrotron. Méréseimet háromszor a 7T-WLS/1-BAMline [265], egyszer pedig a 7T-WLS-1-MySpot [266] nyalábnál végeztem.

#### 4.5.2. Mintaelőkészítés

A mintaelőkészítés során a SEM-FIB méréseknél ismertetetthez hasonló módon jártam el, azzal a különbséggel, hogy az állatok 3512 Kapton window film hordozóra (SPEX Industries Inc., Edison, USA) kerültek, melyet műanyag mintatartóra rögzítettem. Egy ilyen mintatartóra két vagy három különbözően kezelt mintasorozat került, egy sorozat három állatot tartalmazott. A vizsgált mintákról a 4.2. táblázat ad áttekintést.

Kezelőszerszer	Kezelési idő (h)	Mérőhely
Kezeletlen (Cu XANES)	-	BAMline
1 mmol/L CuSO <sub>4</sub> -oldat	24	BAMline
1 mmol/L Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -oldat	24	BAMline
0,5 mol/L CuSO <sub>4</sub> -oldat	1	BAMline
10 mmol/L CuSO <sub>4</sub> -oldat	24	MySpot
50 mg/L ZnO-szuszpenzió	24	MySpot
50 mg/L nano ZnO-szuszpenzió	24	MySpot

4.2. táblázat: XANES módszerrel vizsgált fonálféreg-minták

#### 4.5.3. Referenciavegyületek XANES vizsgálatokhoz

A szilárd referenciavegyületeket elporítottam, kis mennyiségben, filmszerű állapotban kerültek mérésre. A legtöbb vegyületet a Reanal Laborvegyszer Kft.-től rendeltem. A CuI-ot CuSO<sub>4</sub>- és KI-oldatok elegyítésével készítettem. A kémiai reakcióban CuI és elemi jód keletkezett, utóbbi miatt az oldat sötétbarna színű lett, szűrést végeztem vízlégszivattyúval, így a szűrőpapíron barnásfehér csapadék gyűlt össze, melyet alapos mosás után exszikkátorban szárítottam. A CuS-ot CuSO<sub>4</sub>- és Na<sub>2</sub>S-oldatok elegyítésével állítottam elő. Fekete színű csapadék keletkezett, melyet szűrtem, mostam, majd exszikkátorban szárítottam. Teljesen hasonló módon állítottam elő ZnS-ot ZnSO<sub>4</sub>-oldat felhasználásával. Ebben az esetben fehér színű géles csapadék keletkezett, melyhez 96 %-os etanolt (Merck) adtam, ennek hatására a csapadék összetömörödött, szárítás után poríthatóvá vált. Folyékony referenciavegyületeket úgy készítettem, hogy 5 cm<sup>3</sup> 5 mmol/L koncentrációjú CuSO<sub>4</sub>-, illetve ZnSO<sub>4</sub>-oldatot és ugyanilyen térfogatú, tízszeres koncentrációjú különböző aminosavakat, vagy glutationt tartalmazó oldatot öntöttem össze. Az egyes referenciavegyületekről 4.3. A és B táblázatok adnak áttekintést. A folyadék referenciavegyületeket műanyag edénybe



öntöttem, majd FLUXANA TF-350 polikarbonát röntgenfilmmel (Fluxana GmbH, Bedburg-Hau, Németország) fedtem le.

Referenciavegyület	Megjelenés	pH	Mérőhely
CuO	Fekete por	-	BAMline
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	Kék por	-	BAMline
CuSO <sub>4</sub>	Fehér por	-	BAMline
CuI	Barnásfehér por	-	BAMline, MySpot
CuCO <sub>3</sub> * Cu(OH) <sub>2</sub> * x H <sub>2</sub> O	Zöld por	-	BAMline
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Kék por	-	BAMline
Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 3 H <sub>2</sub> O	Kék por	-	BAMline
K <sub>2</sub> Cu[(COO) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Kék por	-	BAMline
Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	Kék por	-	BAMline
Cu-Cys	Fehér csapadék	2,38	MySpot
Cu-Cys (savanyítva)	Színtelen oldat	0,82	BAMline
Cu-His	Sötétkék oldat	2,55	BAMline, MySpot
Cu-Glu	Világoskék oldat	2,75	BAMline
Cu-Gly	Világoskék oldat	2,97	BAMline, MySpot
Cu-GSH	Fehér csapadék	2,34	MySpot
Cu-Aqu	Világoskék oldat	4,73	MySpot
CuS	Fekete por	-	MySpot
Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Kék por	-	MySpot

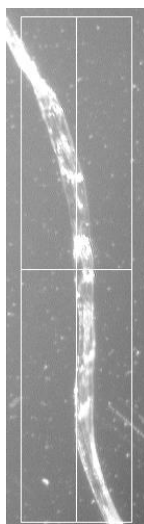
*4.3. A táblázat: XANES módszerrel vizsgált réztartalmú referenciavegyületek*

Referenciavegyület	Megjelenés	pH	Mérőhely
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	Fehér por	-	MySpot
ZnS	Fehér por	-	MySpot
Zn <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> * x H <sub>2</sub> O	Fehér por	-	MySpot
ZnO (nagy szemcsés)	Fehér por	-	MySpot
ZnO (nano)	Fehér por	-	MySpot
Zn-Aqu	Színtelen oldat	5,10	MySpot
Zn-Cys	Színtelen oldat	3,59	MySpot
Zn-His	Színtelen oldat	6,15	MySpot
Zn-Gly	Színtelen oldat	4,26	MySpot
Zn-GSH	Színtelen oldat	2,53	MySpot

4.3. B táblázat: XANES módszerrel vizsgált cinktartalmú referenciavegyületek

#### 4.5.4. A mérések kivitelezése

A méréseket a réz, illetve a cink abszorpciós élénél végeztük. Energia-kalibráció céljából réz- és cinkfólia XANES spektrumát vettük fel. Ezt megtettük a minták mérése előtt és utána is elvégeztük, a nyaláb energiájának lehetséges elhangolódásának korrekciója érdekében. A mérések nem mutattak elhangolódást, ezért azt mondhatjuk, hogy stabilak voltak a körülmények. A fonálféreg-minták többszöri mérése során nem tapasztaltunk sem sugárkárosodást, sem pedig a kémiai környezet megváltozását. Utóbbi a XANES spektrumok azonos szerkezetéből látszik. A BAMline mérőhelyen hajlított kettős kristály monokromátort alkalmaztunk, az előállított nyaláb kb.  $300\ \mu\text{m} \times 1350\ \mu\text{m}$  méretű volt, a vizsgált állatok testének közepénél végeztük a méréseket. A 4.1. ábra mutatja a besugárzott területet. A MySpot nyalábnál Si(111) monokromátort alkalmaztunk. Ebben az esetben a nyaláb kör alakú, kb.  $300\ \mu\text{m}$  átmérőjű volt. A rézzel kezelt állat esetén testének közepénél végeztük a vizsgálatot, nagyszemcsés és nano ZnO-szuszpenzióval kezelt állat esetén három ponton mértünk (fej, testközép, farok). A fluoreszcens fotonok detektálása mindkét mérőhelyen SDD-ral történt. A BAMline mérőhelyen történő méréseknél 227 energiánál mértük az abszorbanciát (illetve az azzal arányos fluoreszcens foton intenzitást), a következő lépésközökkel: 10 eV az él előtt (8880 eV-8960 eV), 0,5 eV az abszorpciós élénél (8960 eV-8998 eV) és 1 eV az él után (8998 eV-9129 eV). A MySpot mérőhelyen több lépésközt használtunk, ezekről a 4.4. A és B táblázatok adnak áttekintést. A mintánkénti mérésszám és az egy energiára jutó mérési idő is eltérő volt az egyes fonálféreg-minták és referenciaanyagok esetén, erről a 4.5. táblázat ad tájékoztatást.



4.1. ábra: Liofilizált fonálféreg Kapton fólián XANES vizsgálatokra előkészítve, a fehér téglalap a besugárzott területet ( $300\ \mu\text{m} \times 1350\ \mu\text{m}$ ) mutatja

<b>Energiatartomány</b>	<b>Lépésköz</b>	<b>Pontok száma</b>
8860 eV- 8920 eV	20	3
8920 eV- 8940 eV	10	2
8940 eV- 8955 eV	5	3
8955 eV- 8965 eV	2	5
8965 eV- 8972 eV	1	7
8972 eV- 9008 eV	0,5	72
9008 eV- 9028 eV	1	20
9028 eV- 9040 eV	2	6
9040 eV-9140 eV	5	20
9140 eV-9240 eV	10	10
9240 eV-9400 eV	20	8
Összesen	-	156

*4.4. A táblázat: A MySpot mérőhelynél alkalmazott lépésközök Cu XANES esetén*

<b>Energiatartomány</b>	<b>Lépésköz</b>	<b>Pontok száma</b>
9500 eV- 9580 eV	20	4
9580 eV- 9610 eV	10	3
9610 eV- 9640 eV	5	6
9640 eV- 9650 eV	2	5
9650 eV- 9655 eV	1	5
9655 eV- 9685 eV	0,5	60
9685 eV- 9710 eV	1	25
9710 eV- 9740 eV	2	15
9740 eV-9780 eV	5	8
9780 eV-9860 eV	10	8
9860 eV-10100 eV	20	12
Összesen	-	151

*4.4. B táblázat: A MySpot mérőhelynél alkalmazott lépésközök Zn XANES esetén*

Minta	Mérőhely	Mérések száma	Mérési idő / pont (s)
Szilárd referenciaanyagok	BAMline	3	1
Folyadék referenciaanyagok	BAMline	4	2
Kezeletlen fonálféreg	BAMline	3	4
1 mmol/L CuSO <sub>4</sub> -oldattal kezelt fonálféreg	BAMline	3	2
1 mmol/L Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -oldattal kezelt fonálféreg	BAMline	3	2
0,5 mol/L CuSO <sub>4</sub> -oldattal kezelt fonálféreg	BAMline	3	1
Cu referenciaanyagok	MySpot	1	3
Zn referenciaanyagok	MySpot	1	10
10 mmol/L CuSO <sub>4</sub> -oldattal kezelt fonálféreg	MySpot	2	10
50 mg/L nagyszemcsés és nano ZnO-szuspenzióval kezelt fonálférgek	MySpot	5	10

#### 4.5. XANES mérések paraméterei

##### 4.5.5. Adatfeldolgozás

A XANES spektrumok analizálásához az Athena szoftvert használtam, mely az IFEFFIT szoftvercsomag egyik programja. A programcsomagot XAS adatfeldolgozásra fejlesztették ki [267]. A program segítségével az adott mintához tartozó spektrumokat összeadtam, majd az így kapott spektrumot normáltam, és elvégeztem az alapvonal kivonását. A K abszorpció éleket az első inflexió pont alapján határoztam meg. Bizonyos minták esetén a minta XANES spektrumát referenciavegyületek spektrumainak lineáris kombinációjával illeszttem. Az illesztés jóságának jellemzésére a program által számolt R-faktort használtam, melyet a következőképpen definiálunk:

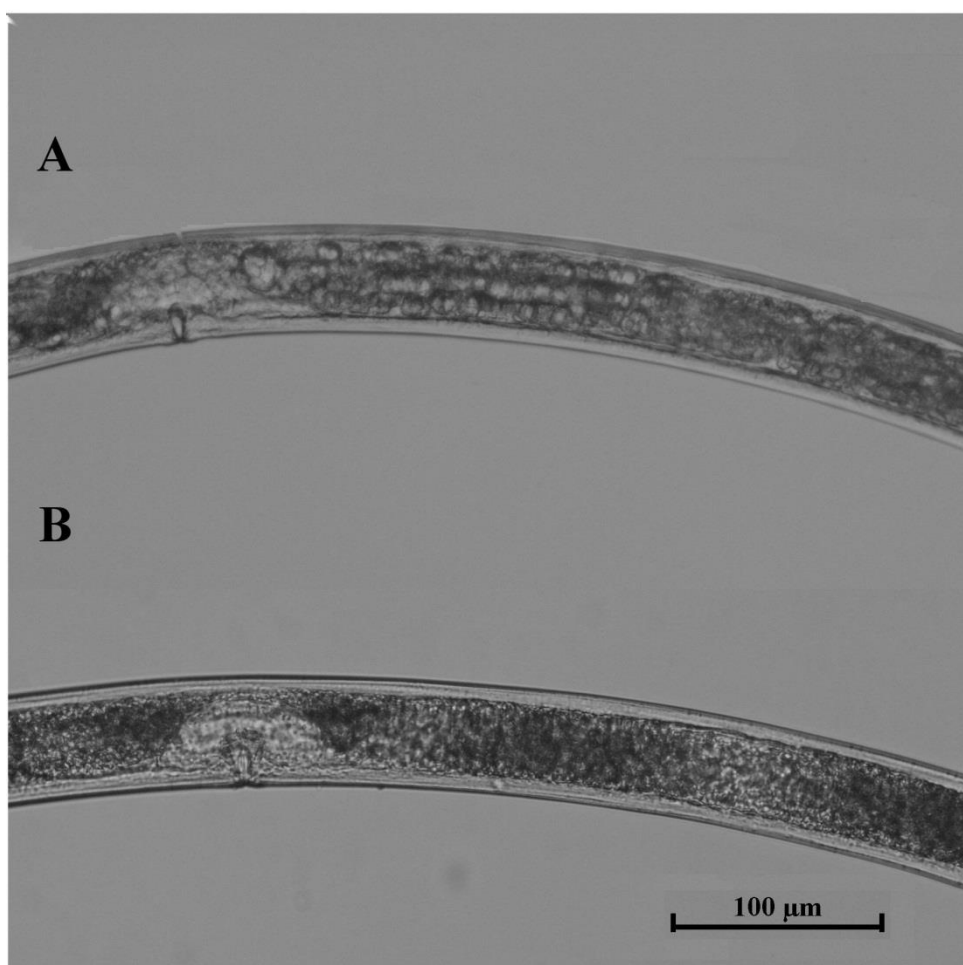
$$\frac{\sum(\text{Illesztett adatpont} - \text{Adatpont})^2}{\sum \text{Adatpont}^2} \quad (3)$$

## 5. Kísérleti eredmények és értelmezésük

### 5.1. Előzetes vizsgálatok

#### 5.1.1. Az állatok éheztetése

Az állatok béltartalmának analitikai mérések előtti eltávolítása fontos feladat, hiszen befolyásolhatja a mérések eredményét, bár erről csak kevés esetben tesznek említést [250, 260]. Az állatok néhány hétig élnek, ezért korlátozottak a lehetőségek az éheztetés tekintetében. Két éheztetési időtartamot vizsgáltam: 1 és 5 nap, az 5.1. ábrán látható az eredmény.



*5.1. ábra: fénymikroszkópos kép az állat testközepéről 1 (A) és 5 nap (B) éheztetést követően*

Látható, hogy a béltartalom 5 nap éheztetés után sem távozik el teljesen, hosszabb éheztetésre viszont nincs lehetőség, mert akkor az állatok jelentős része elpusztulna. Ezért munkám során minden esetben 5 napos csapvízben történő éheztetést alkalmaztam. Ennyi idő telt el az

állatok talajból történő kinyerése és a kezelések megkezdése, illetve kezeletlen állat esetén a mintafelvétel megkezdése között.

### 5.1.2. Az állatok tömegének meghatározása

Az állatok száraz tömege ( $2,4 \pm 0,2$ )  $\mu\text{g}$ -nak adódott, ezt összesen 95 állat mérésével határoztam meg, a szórást három különböző mérés (35, 30, 30 egyed /minta) eredményéből számoltam. A kísérleti részben bemutatott becsléssel meghatározott nedves tömeg 100 állat vizsgálata során ( $6,4 \pm 1,1$ )  $\mu\text{g}$ -nak adódott. A száraz tömeg meghatározása még 20-30 állat esetén is eléggé nehézkes, az általam használt hat tizedes pontosságú mikromérleggel 1 állat esetén gyakorlatilag lehetetlen. Ezért azoknál a vizsgálatoknál, ahol koncentrációt határoztam meg, minden esetben becsléssel határoztam meg a nedves tömeget.

### 5.1.3. Szén- és nitrogéntartalom

A szén- és nitrogéntartalom meghatározásának eredményeit az 5.1. táblázatban foglaltam össze.

	Szén / fonálféreg ( $\mu\text{g}$ )	Nitrogén / fonálféreg ( $\mu\text{g}$ )	Szénkoncentráció ( $\text{ng}/\mu\text{g}$ )	Nitrogénkoncentráció ( $\text{ng}/\mu\text{g}$ )
<b>Átlag</b>	1,84	0,39	296	62
<b>Szórás</b>	0,16	0,03	27	5
<b>Relatív szórás (%)</b>	8,7	7,7	9,0	7,4

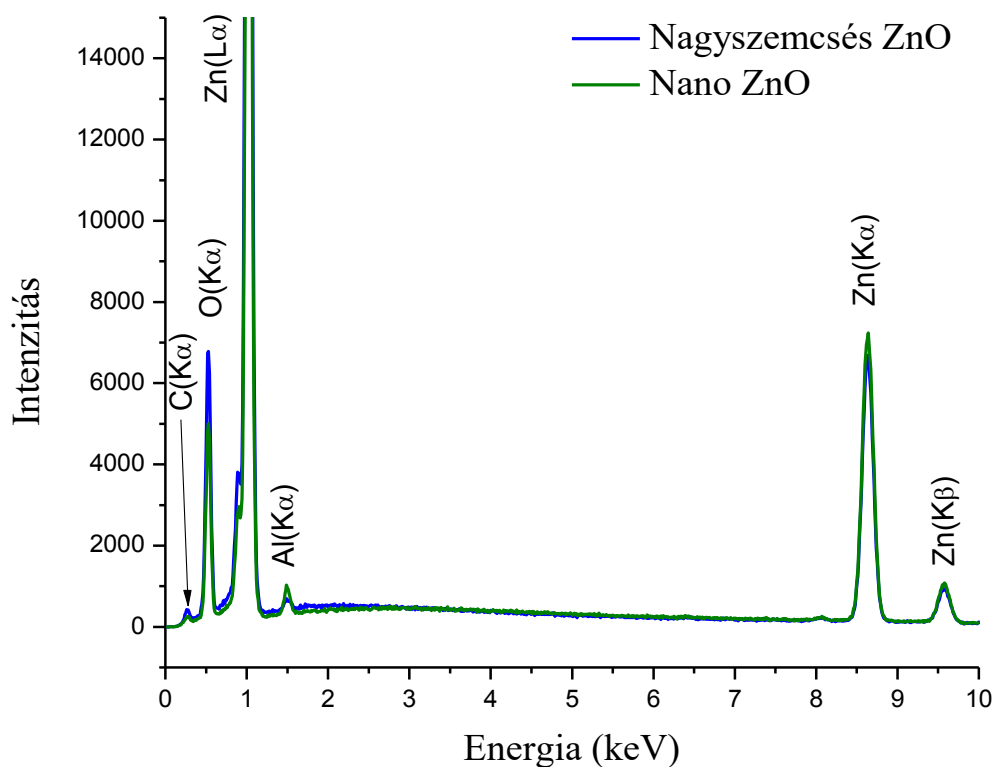
5.1. táblázat: Fonálférgek szén- és nitrogéntartalma

Az irodalomban általában a C/N arányt adják meg, ez az esetünkben  $4,78 \pm 0,31$ -nek adódott. Ez kisebb, mint a baktériumevő (5,89; [268]) és gombaevő (8,0-9,0; [110]) talajlakó fonálférgekre közölt érték.

## 5.2. Nagyszemcsés és nano ZnO-szuszpenziók fizikai és kémiai jellemzése

### 5.2.1. Összetétel

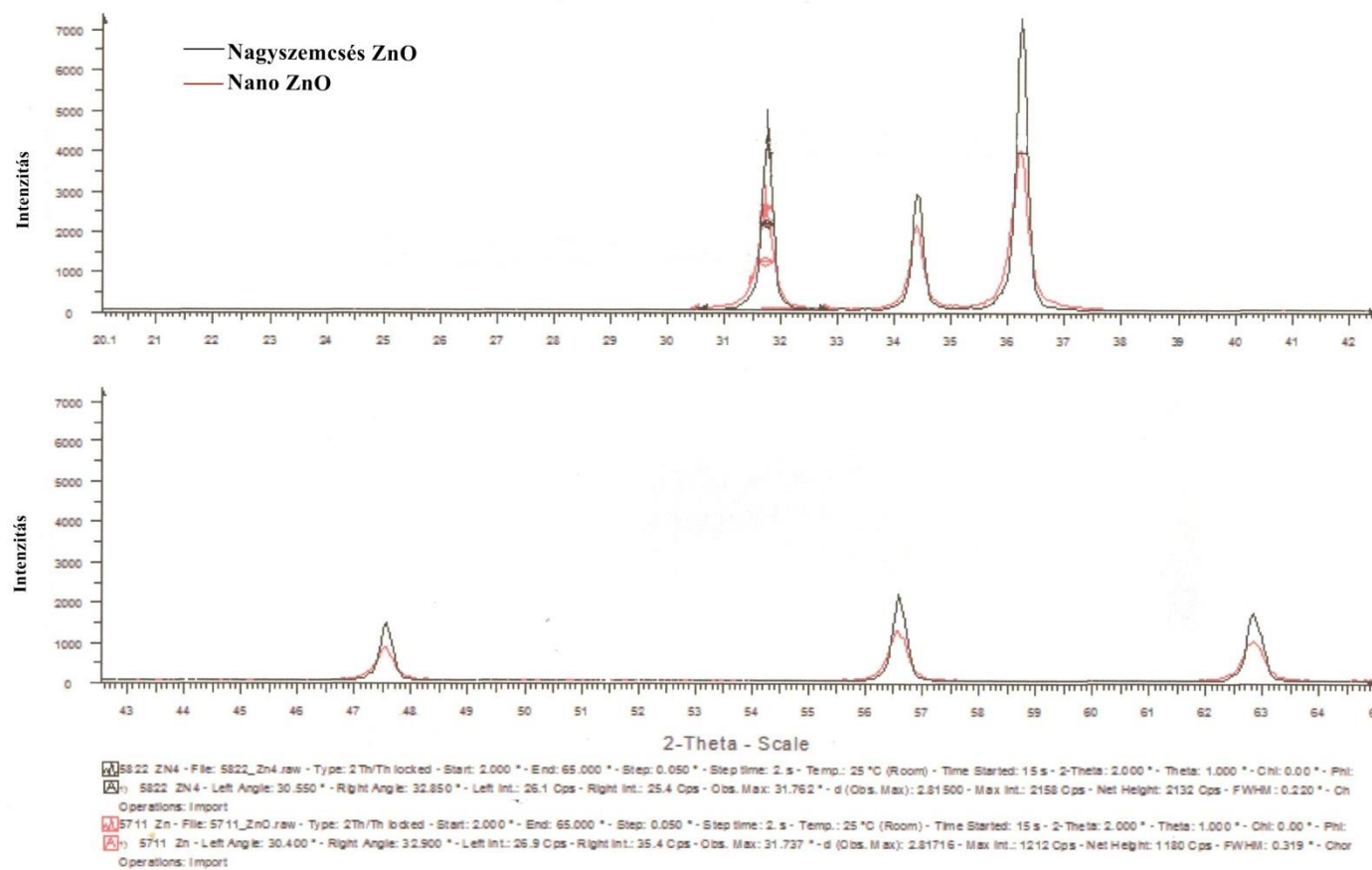
Az EPMA mérés eredménye az 5.2. ábrán látható. A specifikáción feltüntetett alumínium tényleg jelen van a nano ZnO-szuszpenzióban. Kis mennyiségű szén is találtunk mindkét esetben, de ennek jele származhatott a mintahordozóból is.



5.2. ábra: A nagyszemcsés és nano ZnO-szuszpenziók összetétele EPMA módszerrel vizsgálva

Az 5.3. ábrán a nagyszemcsés és nano ZnO-ról készült diffraktogramot láthatjuk. A két anyag kristály-szerkezete azonos (cinkit módosulat), eltérés csak az intenzitásokban van, melyet a részecskék eltérő mérete okoz.

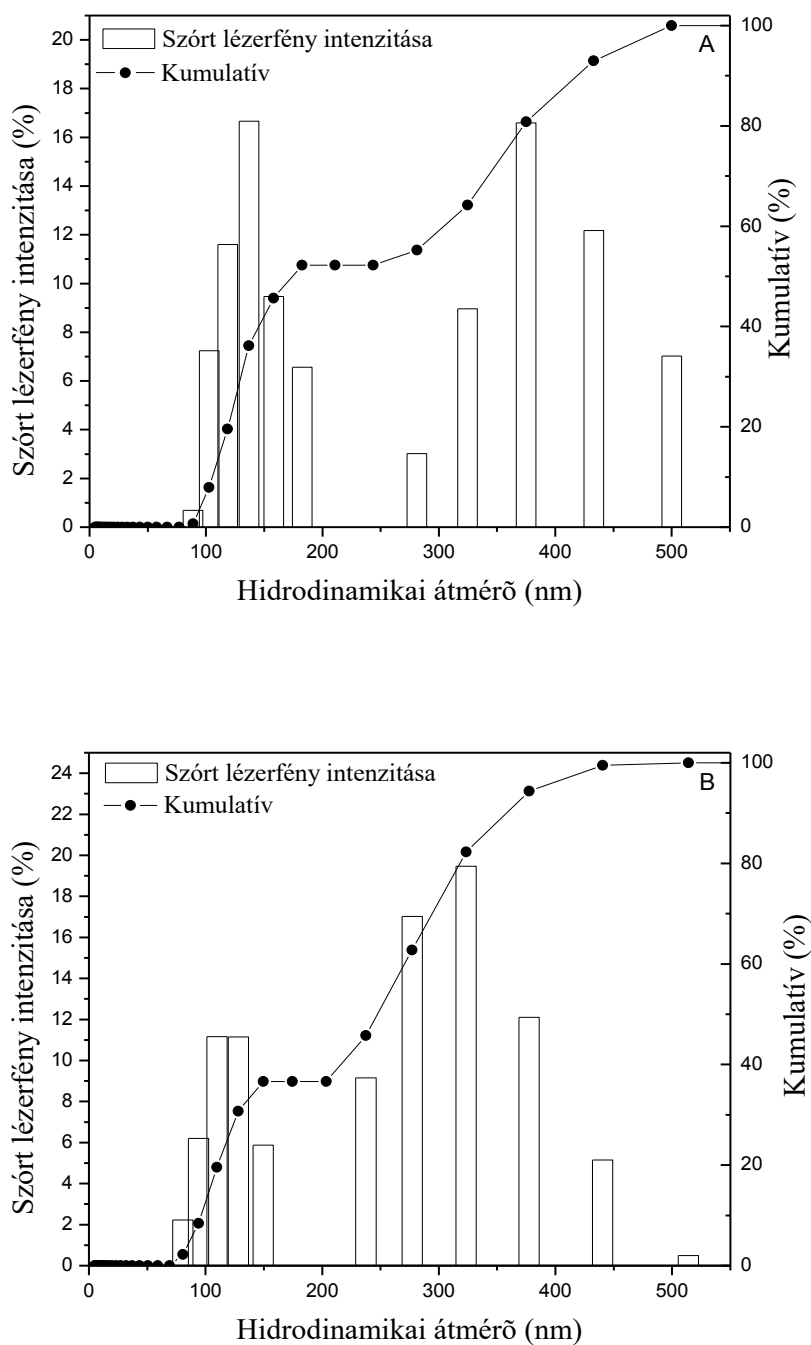




5.3. ábra: Nagyszemcsés és nano ZnO diffraktogramja

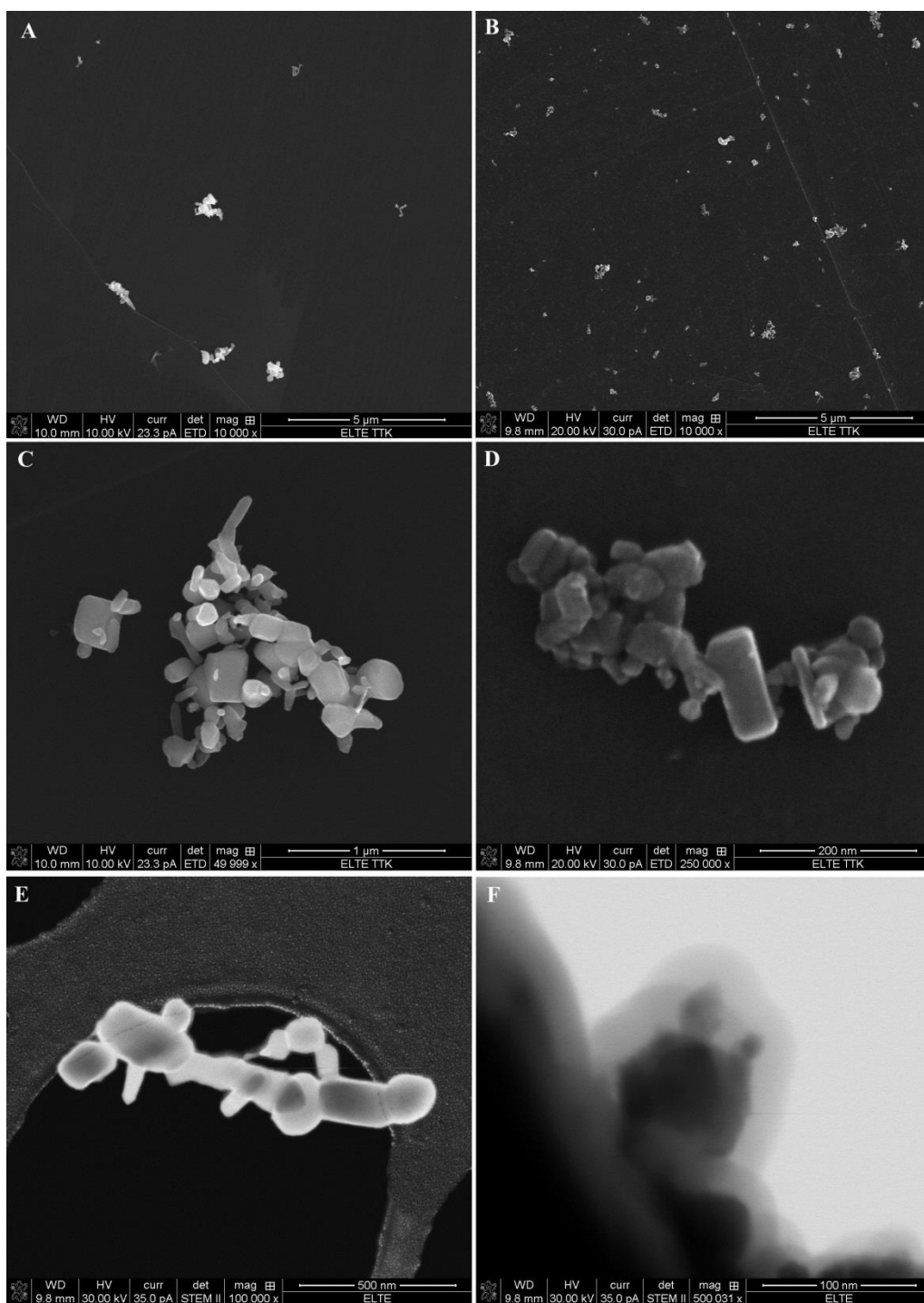
### 5.2.2. A részecskék méretének és morfológiájának jellemzése

A dinamikus fényszóródás mérés eredménye alapján megállapítható, hogy a nano ZnO-szuszpenzióban két fő méretfrakció található (5.4. A ábra), kb. 150 nm és 400 nm átlagos hidrodinamikai átmérővel. Előbbi van jelen nagyobb mennyiségben, hiszen az intenzitások közel egyformák, de a szórt fény intenzitása a részecskeméret négyzetével arányos.



5.4. ábra: Részecskeméret-eloszlás frissen készített ZnO-szuszpenzióban (A) és ugyanabban a mintában 90 perccel később (B)

Ugyanazt a mintát megvizsgáltuk 90 perccel később is (5.4. B ábra). Jelentős változás nem volt kimutatható, tehát az aggregáció nem jelentős ilyen töménységű mintában.

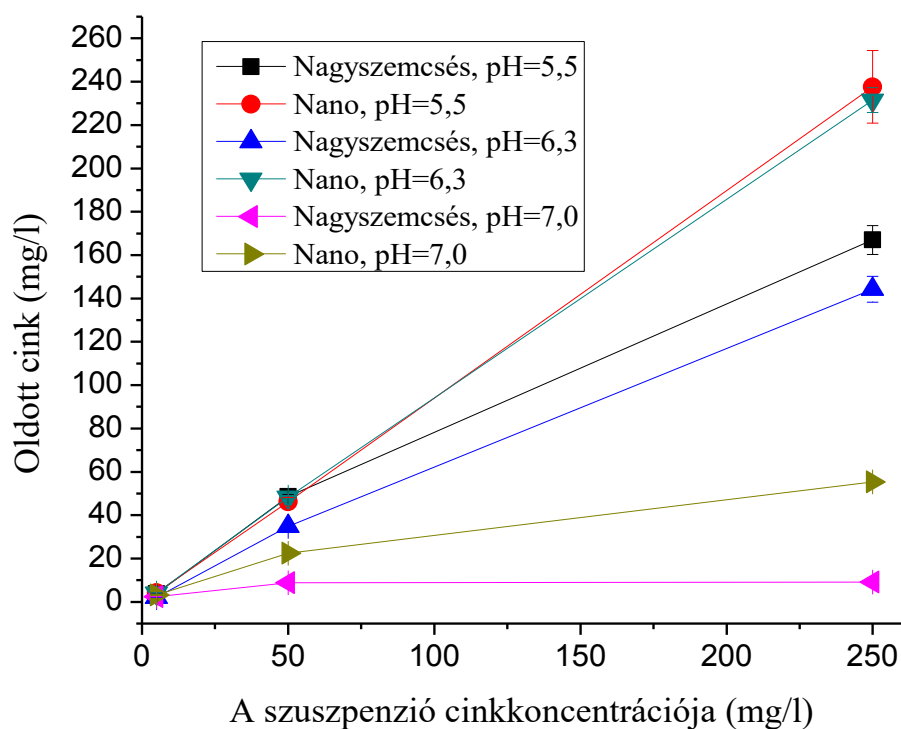


5.5. ábra: 50 mg/L nagyszemcsés (A, C, E) és nano (B, D, F) ZnO-szuszpenzió SEM (A, B, C, D) és STEM képe (E, F)

A nagyszemcsés és nano ZnO-szuszpenziók SEM és STEM vizsgálata (5.5. ábra) alapján megállapítható a jelentős méretkülönbség a részecskék közt. A nano forma esetén dinamikus fényszóródási méréseket is végeztünk (a nagyszemcsés forma esetén a részecskék nagy mérete miatt erre nem volt lehetőség), az eredmények összhangban vannak az elektronmikroszkópos mérések eredményeivel. Az 5.5. F ábrán a nano ZnO-szuszpenzió STEM képe látható. A részecske körül látható árnyék valószínűleg a stabilizálószer, melyet a részecskék aggregációjának elkerülésére alkalmaznak. Ennek jelenlétéről az anyag specifikációjában nem található információ.

### 5.2.3. A ZnO vízdíhatóságának vizsgálata

Az oldott cink mennyiségét vizsgáltam a következő három paraméter függvényében: koncentráció, pH, részecskeméret. A mérések eredményét az 5.6. ábra mutatja.



5.6. ábra: Oldott cink mennyisége különböző ZnO-szuszpenziókban

Látható, hogy az oldott cink mennyisége minden esetben nagyobb a nano, mint a nagyszemcsés forma esetén. Ennek nem csak tényleges oldhatóságbeli különbség lehet az

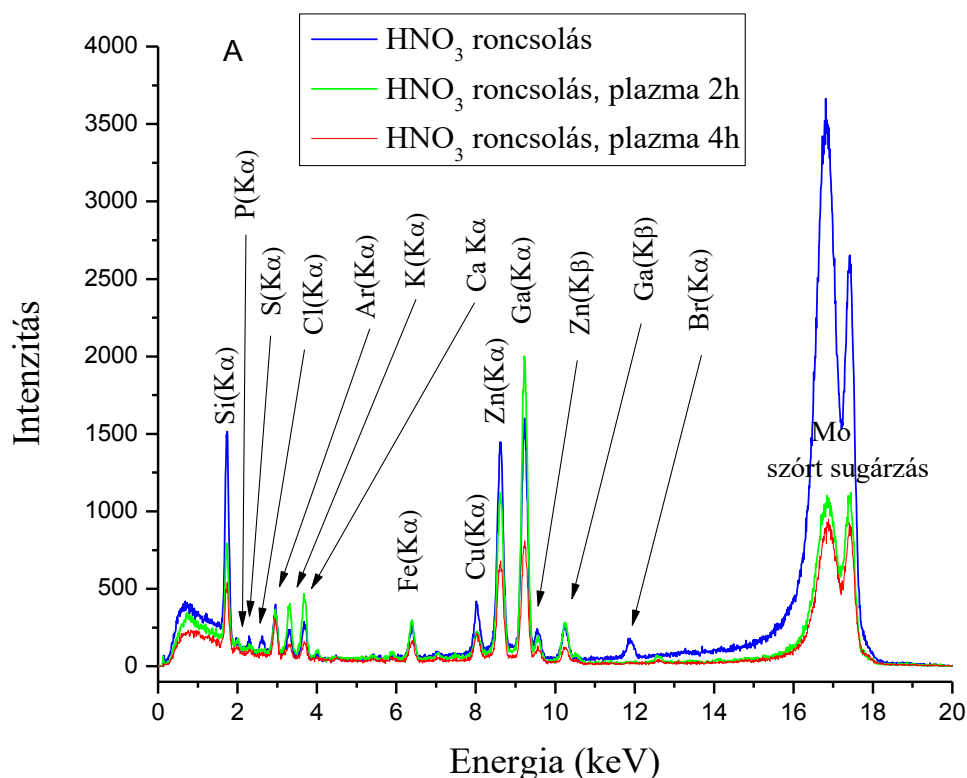
oka, hanem az oldott cink mennyiségének definíciójában. Hiszen ezt úgy határoztuk meg, hogy a nem oldott ZnO-t centrifugálással távolítottuk el. Főképp nano ZnO esetén előfordulhat, hogy nem volt tökéletes a részecskék eltávolítása. Az oldhatóságot 3 különböző pH-n vizsgáltam: 7,0 (a szuszpenziók pH-ja 7 körüli); 6,3 (pH a *C. elegans* testén belül [269]); 5,5 (a barna erdőtalaj pH-jának alsó határértéke [270]). A tapasztalt pH-függés igen jelentős, pH=5,5-nél már szemmel is látható az oldhatatlan csapadék mennyiségének csökkenése.

## 5.3. TXRF spektrometriai vizsgálatok

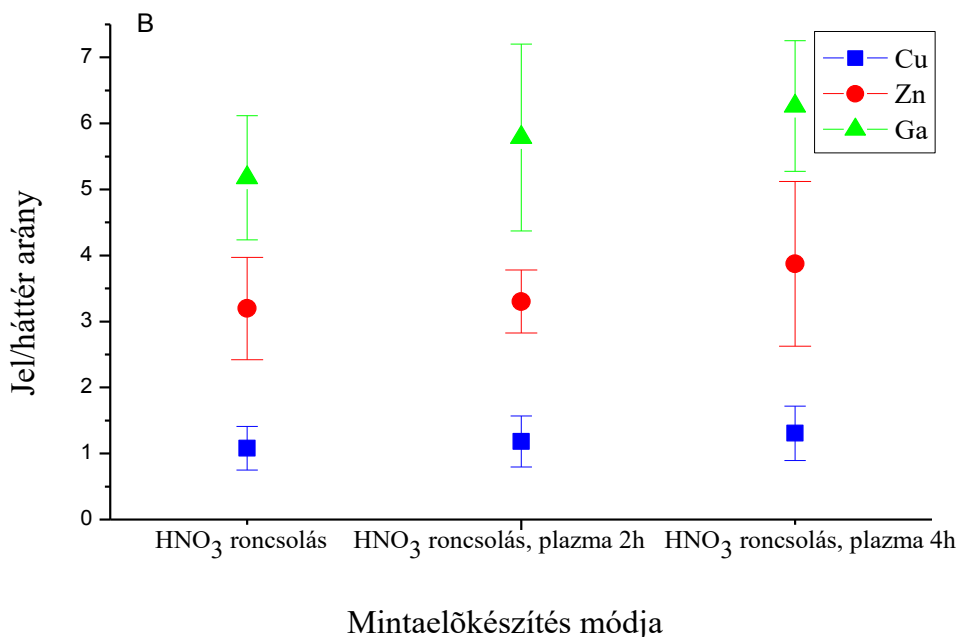
### 5.3.1. Módszerfejlesztés

#### 5.3.1.1. Hideg oxigénplazmás roncsolás

Három különböző mintaelőkészítési módszer hatékonyságát vizsgáltam: csak HNO<sub>3</sub>-as roncsolás; HNO<sub>3</sub>-as és hideg oxigénplazmában történő roncsolás (2 óra); HNO<sub>3</sub>-as és hideg oxigénplazmában történő roncsolás (4 óra). A kezeletlen állatból készült minta spektrumát az 5.7. A ábrán tüntettem fel a három különböző esetre, az 5.7. B ábra a jel/háttér arányokat mutatja 3 különböző elem esetén.



5.7. A ábra: Fonálféreg-minta TXRF spektruma három különböző mintaelőkészítés esetén



5.7. B ábra: Jel/háttér arány három különböző mintaelőkészítés esetén

Látható, hogy plazmás roncsolás nélkül jelentős mértékű a röntgensugárzás szóródása. Két óras hideg oxigénplazmás roncsolást követően ez jelentősen csökken, további két óra roncsolást követően már csak jóval kisebb mértékben csökken, de ebben az esetben bizonyos elemek jelének intenzitása is csökken. A jel/háttér arány növekszik hidegplazmás roncsolás alkalmazásával, vagy annak időtartamának növelésével. Ezért a továbbiakban HNO<sub>3</sub>-as és 2 óráig tartó hideg oxigénplazmás roncsolást alkalmaztam.

#### 5.3.1.2. Kezeletlen fonálférgek mikro- és nyomelemtartalma

A kifejlesztett TXRF spektrometriai módszerrel a kezeletlen állatokból 9 mikro- illetve nyomelem koncentrációját tudtam meghatározni (5.2. táblázat). Az eredményeket összevetettem ICP-MS mérések eredményével (5.3. táblázat). Ezek alapján megállapítható, hogy a kifejlesztett TXRF módszer alkalmas a vizsgált faj egyedeinek elemanalitikai vizsgálatára. Nagy előnye – szemben az ICP-MS módszerrel –, hogy egyedi analízist tesz lehetővé. A későbbiekben ezt a módszert használtam különböző kezeléseknél kitett állatok mikro- és nyomelemtartalmának meghatározására.

	P	S	Ca	K	Fe	Zn	Cu	Ni	Mn
<b>Átlagos koncentráció (ng/μg)</b>	3,13	3,72	2,16	1,51	0,34	0,30	0,068	0,018	0,014
<b>Szórás</b>	0,64	0,64	0,45	0,38	0,05	0,03	0,012	0,003	0,002
<b>Relatív szórás (%)</b>	20,4	17,3	21,0	25,3	15,6	9,4	18,1	17,8	16,1

5.2. táblázat: Fonálférgek mikro- és nyomelemtartalma TXRF mérések alapján (11 minta)

Elem	ICP-MS	TXRF	Eltérés (%)
<b>Ca</b>	2,01 ± 0,17	2,16 ± 0,45	+ 7,8
<b>Fe</b>	0,39 ± 0,06	0,34 ± 0,05	- 11,9
<b>Zn</b>	0,27 ± 0,04	0,30 ± 0,03	+ 13,7
<b>Cu</b>	0,067 ± 0,009	0,068 ± 0,012	+ 1,6
<b>Ni</b>	0,016 ± 0,003	0,018 ± 0,003	+ 9,4
<b>Mn</b>	0,013 ± 0,002	0,014 ± 0,002	+ 5,6

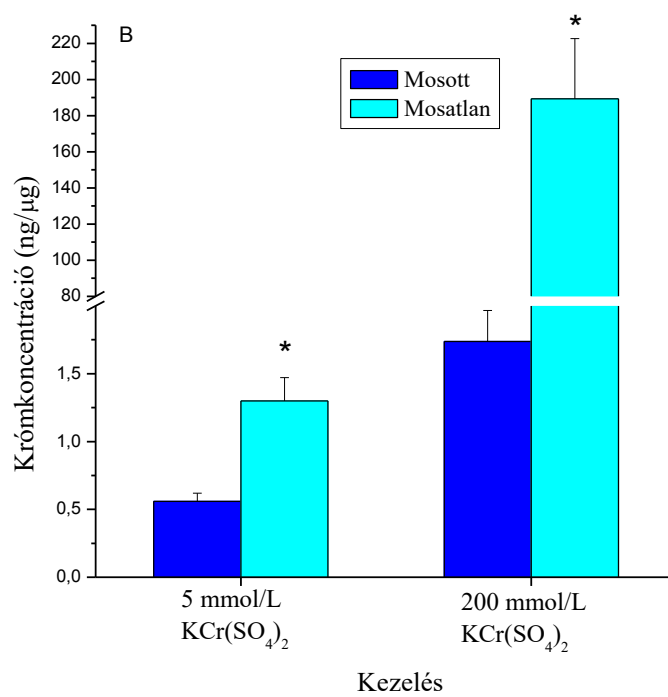
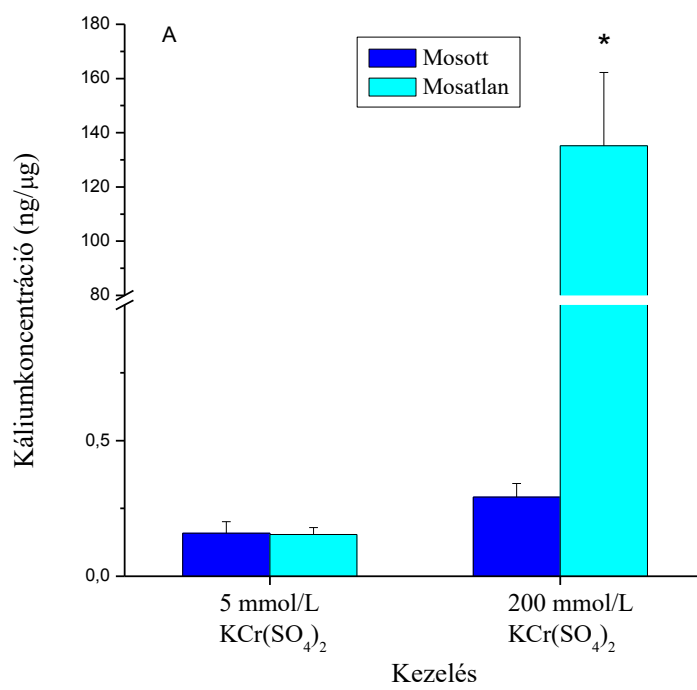
5.3. táblázat: TXRF és ICP-MS módszerrel mért koncentrációk (ng/μg) összehasonlítása

### 5.3.2. Elemfelvételi vizsgálatok

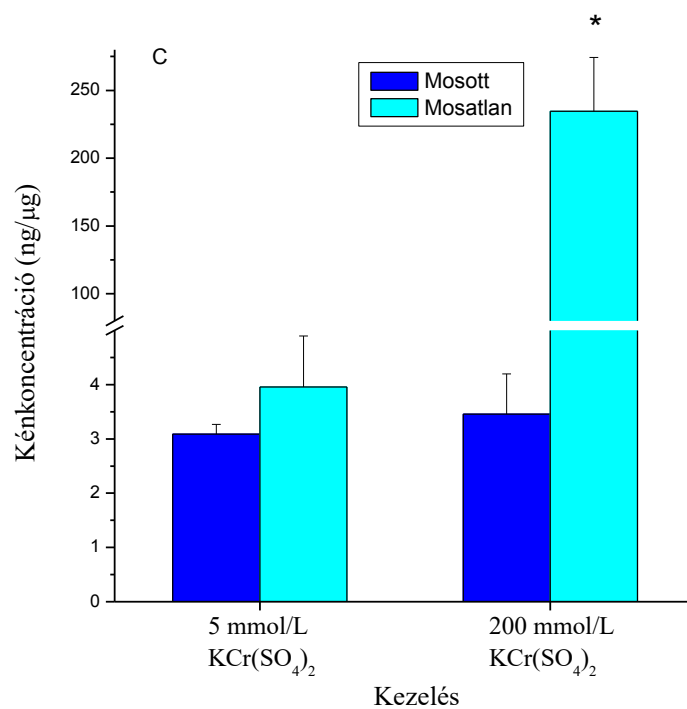
#### 5.3.2.1. A mosás hatásának vizsgálata

Vizsgáltam öblítés nélküli állatok elemtartalmát TXRF módszerrel. A kapott koncentrációértékeket összehasonlítottam azokkal a mérési eredményekkel, melyek során az állatokat kezelés után 1 percig öblítettem. Az 5.8. ábrán a  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ -tal kezelt állatok kálium-, króm- és kéntartalma látható, míg az 5.9. ábrán a nagyszemcsés és nano ZnO-szuszpenziókkal kezelt állatok cinktartalma.  $\text{K}_2\text{Cr}(\text{SO}_4)$ -oldattal történő kezelés esetén a legtöbb esetben szignifikáns eltérést tapasztaltam a mosott és mosatlan állatokban adott elem koncentrációjában. A töményebb koncentrációjú oldat esetén nagyságrendbeli különbség volt. ZnO-szuszpenzióval történő kezelés esetén a töményebb nagyszemcsés szuszpenziónál nem volt szignifikáns a különbség. Valószínűleg itt már olyan mértékű az aggregáció, hogy az állat testén megtapadt részecskék desztillált vizes mosással sem távolíthatók el. Ezek alapján elmondható, hogy az állat felületén jelentős mértékű a kezelőszer gyenge (vizes öblítéssel eltávolítható)

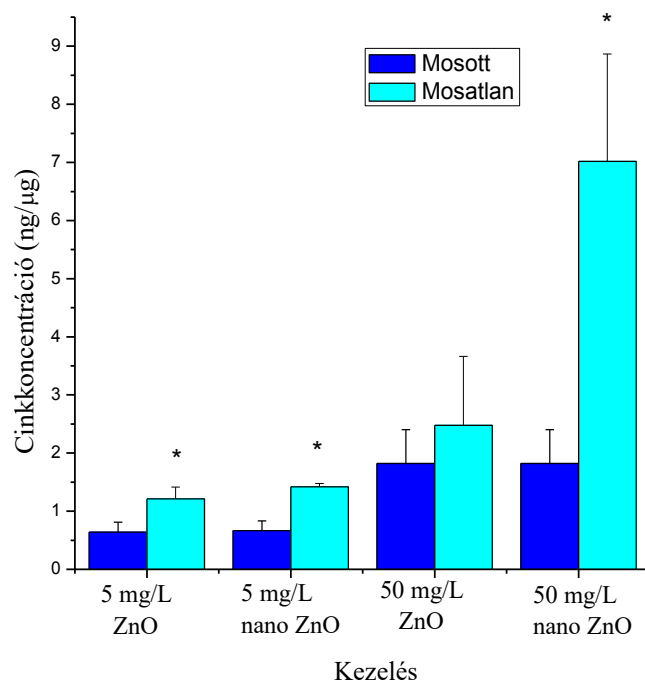
megkötődése. A továbbiakban, minden kezelés után elvégeztem az egy percig tartó öblítést Milli-Q vízben.







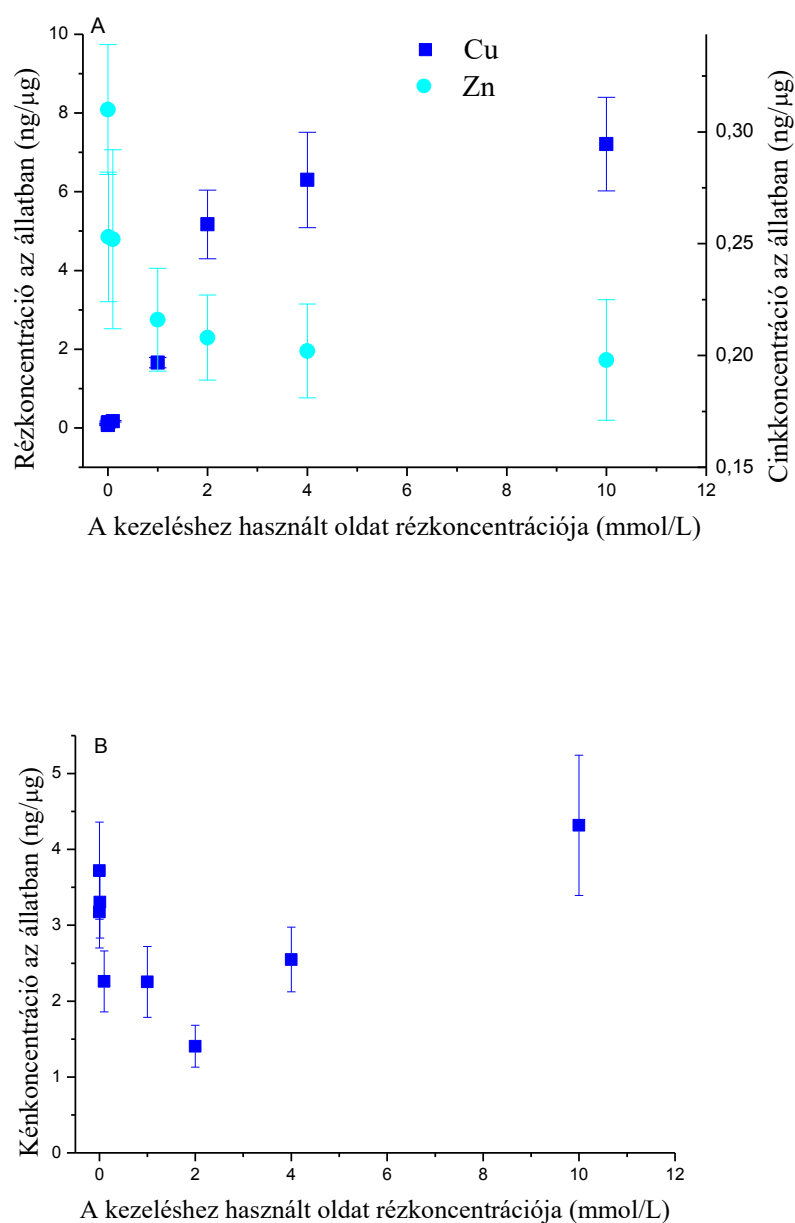
5.8. ábra:  $K_2Cr(SO_4)_2$ -oldattal kezelt állatok kálium- (A), króm- (B) és kén- (C) tartalma, \*: szignifikáns különbség a mosott és mosatlan minta közt,  $P < 0,05$



5.9. ábra: ZnO-szuszpenziókkal kezelt állatok cinktartalma, \*: szignifikáns különbség a mosott és mosatlan minta közt,  $P < 0,05$

### 5.3.2.2. Rézfelvétel vizsgálata

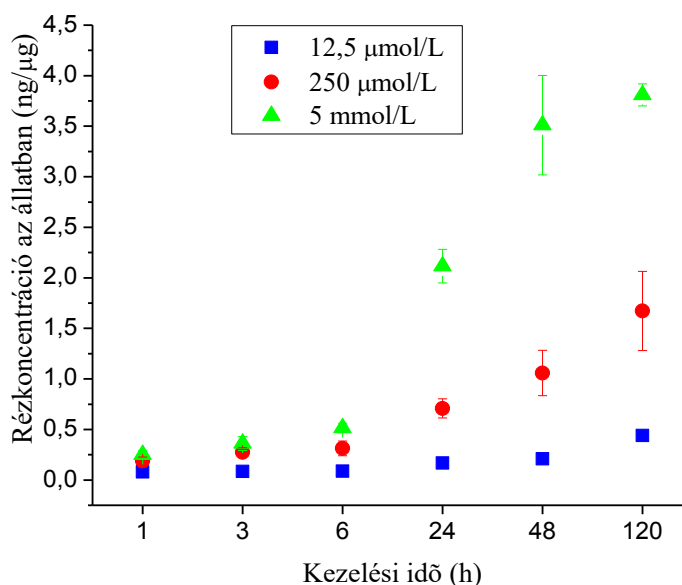
CuSO<sub>4</sub>-oldattal történő kezelés esetén növelve az oldat rézkoncentrációját, az állat réztartalma növekedett, cink tartalma csökkent (5.10. A ábra). A többi, TXRF-módszerrel mérhető elem koncentrációja nem mutatott függést a kezelőszer koncentrációjától. Az 5.10. B ábrán a minták kéntartalmát tüntettem fel, ez sem mutat koncentrációfüggést, tehát az anion felvétele nem jelentős mértékű, valószínűleg a kezelőszer toxikus hatásában sem játszik szerepet.



5.10. ábra: CuSO<sub>4</sub>-oldattal történő kezelés hatása az állatok réz-, cink- (A) és kéntartalmára (B)

A réz, vas és cink homeosztázisa hatással van egymásra. Számos esetben figyelték meg a másik két elem koncentrációjának megváltozását a harmadik elemmel történő kezelések esetén különböző biológiai mintákban [271, 272]. A réz és cink közötti antagonizmus már nagyon régóta ismert [273]. A cink fontos szerepet játszik a cink homeosztázis kialakításában és a réz detoxifikációjában is. A Cu(I) azon kevés kationok egyike, mely képes a cinket kiszorítani a metallotionein-komplexből [38]. Vizsgálataim során a rézzel történő kezelés vastartalomra gyakorolt hatását nem tudtam kimutatni, nem tapasztaltam trendet a vaskoncentráció kezelési rézkoncentrációtól való függésében.

Vizsgáltam a rézfelvétel időfüggését három különböző koncentrációnál, ebben az esetben csak a réz mintabeli koncentrációjában tapasztaltam időfüggést (5.11. ábra).



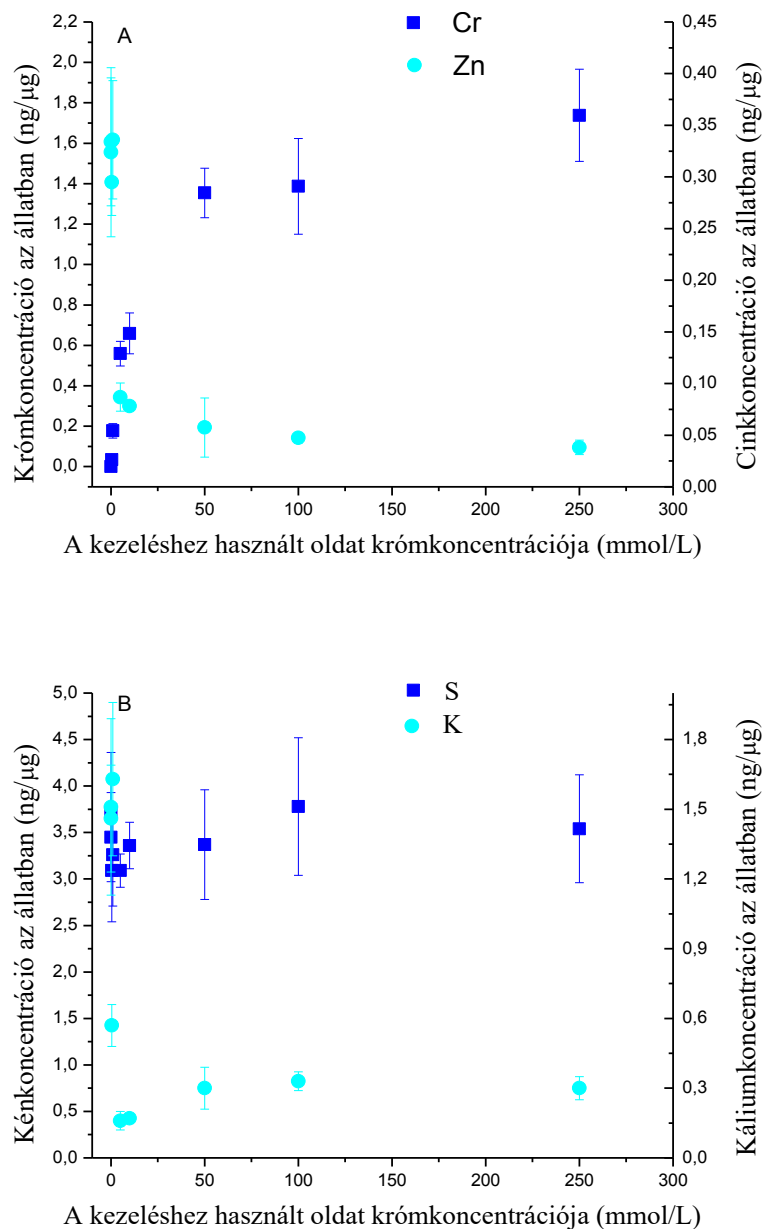
5.11. ábra: A réz felvételének időfüggése

A görbék lefutása teljesen hasonló a három koncentráció esetén, bár a két hígabb koncentrációjú oldatnál még valószínűleg nem értük el a telítési tartományt.

#### 5.3.2.3. Krómfelvétel vizsgálata

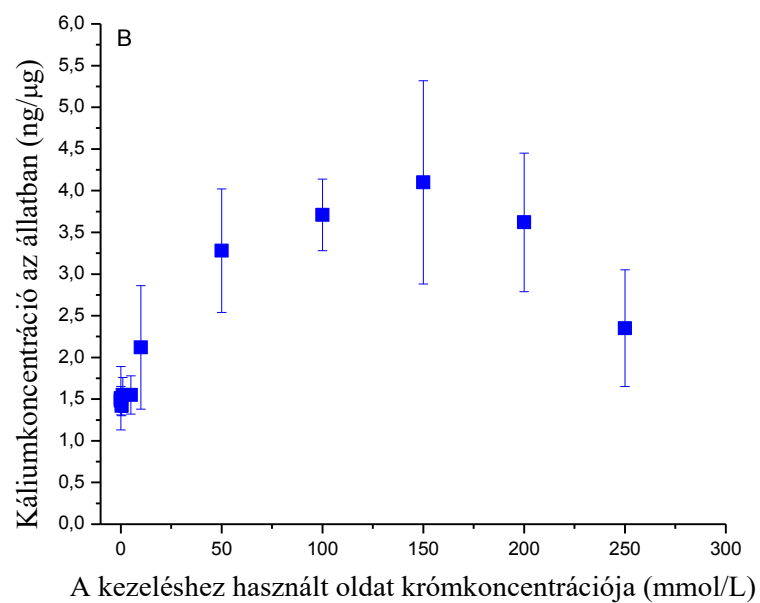
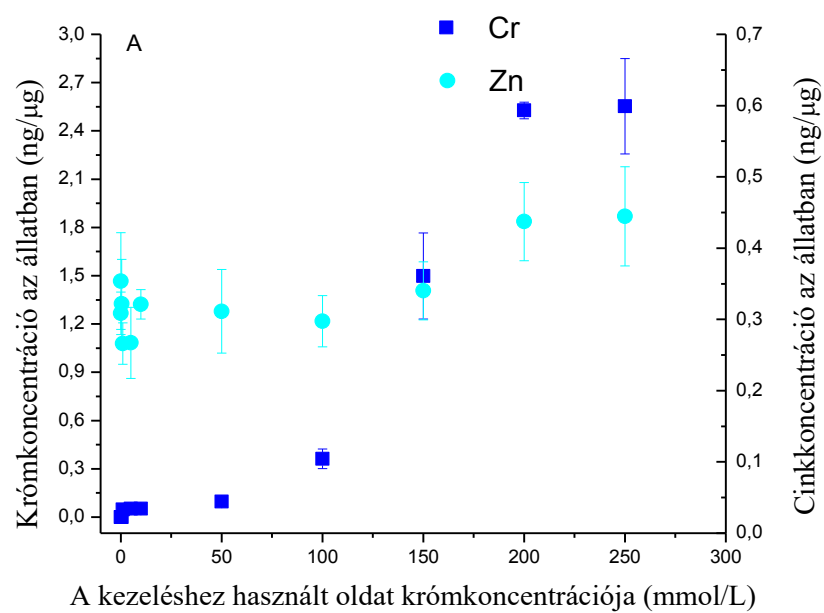
Vizsgáltam a két stabil krómforma (Cr(III) és Cr(VI)) elemtartalomra kifejtett hatását. A kezelőszerek egyéb összetevői ebben az esetben sem mutattak dúsulást az állatban a kezelési koncentráció növelésével. A kálium koncentrációjában azonban komoly eltéréseket

tapasztaltam – mindkét irányban (5.12. B és 5.13. A ábrák) – a különböző kezelések esetén, ennek oka az lehet, hogy a  $K^+$ -ionra nagy mozgékonyág jellemző biológiai rendszerekben, így annak koncentrációja valószínűleg érzékenyen függ számos paramétertől.



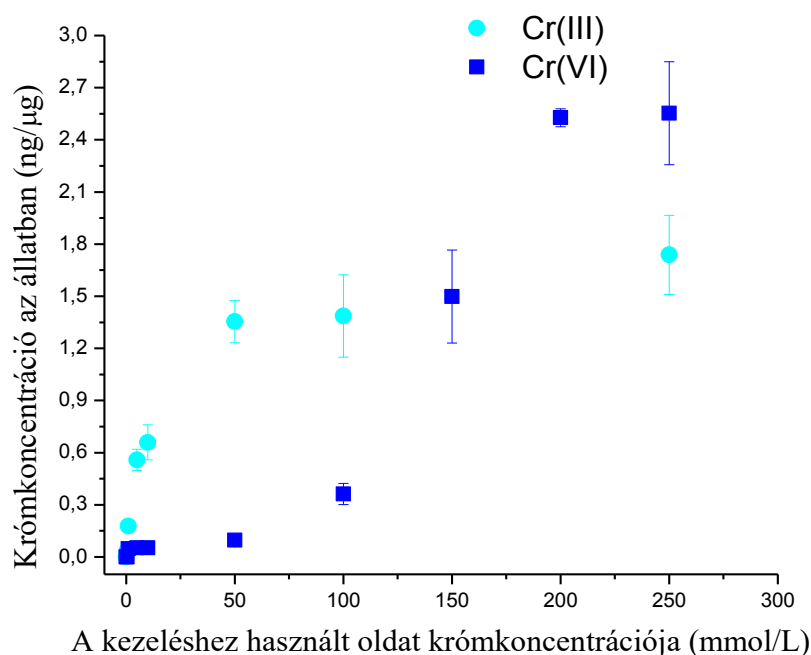
5.12. ábra:  $KCr(SO_4)_2$ -oldattal történő kezelés hatása a fonálférgek króm-, cink- (A); kén- és káliumtartalmára (B)

Az állat cinktartalma a kezeléshez használt  $KCr(SO_4)_2$ -oldat koncentrációját növelve csökkent (5.12. A ábra),  $K_2CrO_4$ -oldattal történő kezelés esetén nem tapasztaltam változást az állat cinktartalmában (5.13. A ábra).



5.13. ábra:  $K_2CrO_4$ -oldattal történő kezelés hatása a fonálférgek króm-, cink- (A) és káliumtartalmára (B)

Az 5.14. ábrán látható a krómfelvétel mértékének összehasonlítása a hármas és hatos vegyértékállapotú krómot tartalmazó oldatokra. A görbe lefutása hasonló a két esetben (telítési görbe), de a krómfelvétel mértéke eltérő. Kisebb – és környezeti szempontból releváns – koncentrációk esetén Cr(III) esetén lényegesen nagyobb a felvétel, viszont a telítési tartomány a Cr(VI) esetében nagyobb krómkoncentrációnál jelentkezik, és a felvétel is nagyobb mértékű.

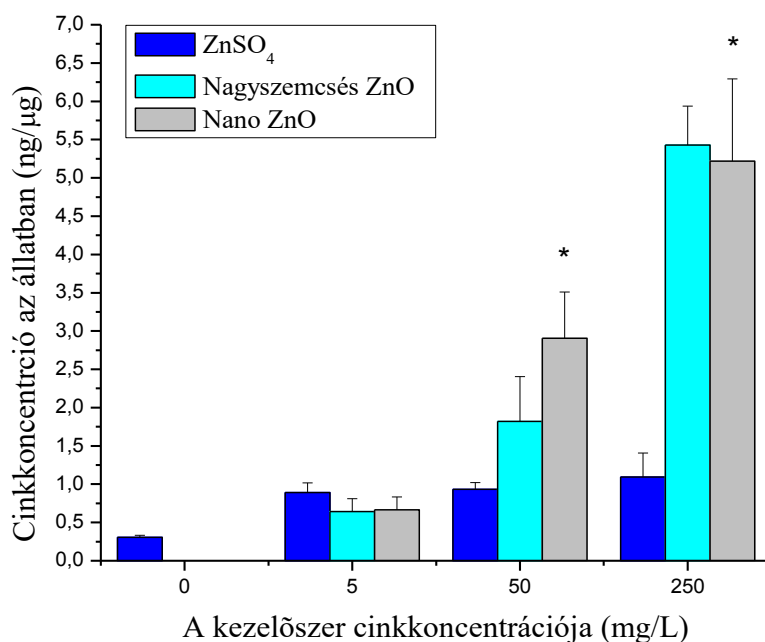


5.14. ábra: A Cr(III) és Cr(VI) felvételének összehasonlítása

A többi vizsgálható esszenciális elem koncentrációjának változásában nem találtam trendet. A Cr(III) cinktartalmat csökkentő hatásával kapcsolatos információt nem találtam az irodalomban.

#### 5.3.2.4. Cinkfelvétel vizsgálata

Vizsgáltam a nano ZnO felvételét, összehasonlítás céljából végeztem kísérleteket azonos koncentrációjú nagyszemcsés ZnO-szuszpenzióval és ZnSO<sub>4</sub>-oldattal is. A TXRF vizsgálatok eredményeit az 5.15. ábrán foglaltam össze.



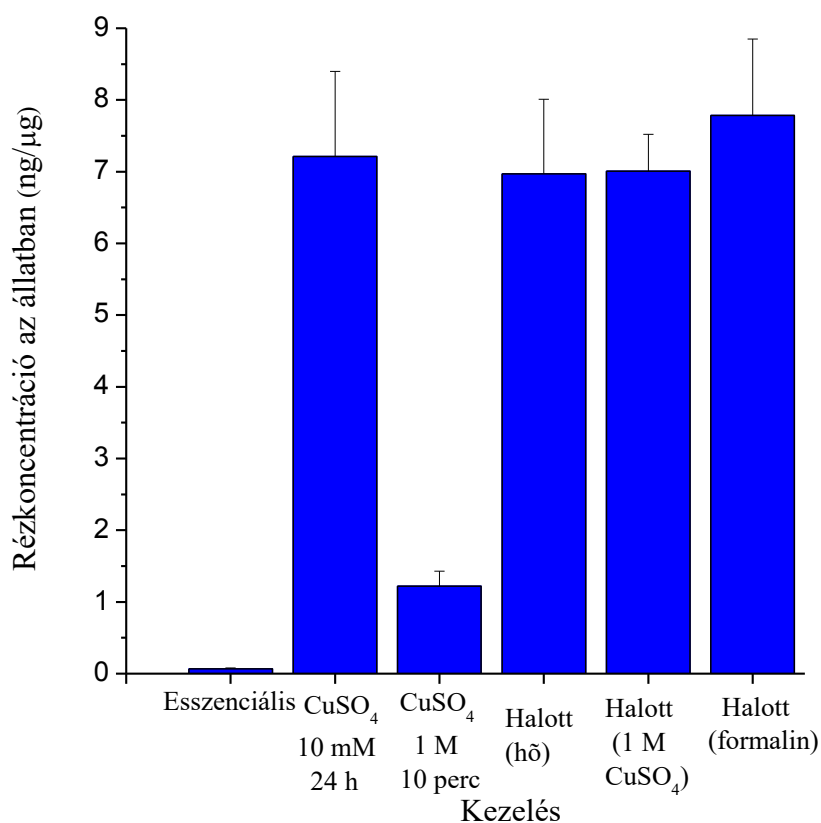
5.15. ábra:  $\text{ZnSO}_4$ -oldattal, nagyszemcsés és nano ZnO-szuszpenzióval történő kezelés hatása a fonálférgek cinktartalmára, \*: szignifikáns különbség a  $\text{ZnSO}_4$ -oldattal és a nano ZnO-szuszpenzióval történő kezelések között,  $P < 0,05$

Kétmintás t-próbát végeztem a különböző kezelések összevetésére. A  $\text{ZnSO}_4$ -oldattal való kezelés nem mutatott koncentrációfüggést, de az esszenciálisnál nagyobb a cinkkoncentráció a mintákban. A leghígabb koncentráció (5 mg/L) esetén a nano ZnO-szuszpenzióval kezelt állatok esetén nincs szignifikáns különbség a cinktartalmat illetően sem a nagyszemcsés ZnO-szuszpenzióval, sem a  $\text{ZnSO}_4$ -oldattal történő kezelés esetén végezve az összehasonlítást. A nagyszemcsés és nano ZnO-szuszpenziók esetén a két másik koncentrációnál (50 és 250 mg/L) sem volt szignifikáns a különbség. Az oldatos kezeléssel végzett összehasonlítás esetén viszont szignifikáns a különbség mindkét koncentrációnál. A többi vizsgálható esszenciális elem koncentrációjára nem voltak hatással a kezelések. Ezek alapján megállapítható, hogy a ZnO-szuszpenzióval történő kezelés esetén, függetlenül attól, hogy nano vagy nagyszemcsés formában van jelen a ZnO a kezelőszerekben, annak felvétele megtörténik, vagy legalábbis olyan mértékű a kötődés az állat testfelszínéhez, hogy a vizes öblítés nem tudja eltávolítani. A nagyszemcsés és nano szuszpenziókból történő felvétel közti különbség viszont nem volt kimutatható TXRF módszerrel. Az irodalomban különböző vizsgált fajok esetén eléggé eltérőek az eredmények mind a toxicitás, mind a felvétel tekintetében. A korábban említett

közleményben Hooper és munkatársai erősebb toxikus hatást figyeltek meg  $\text{ZnCl}_2$ -oldat, mint nano  $\text{ZnO}$ -részecskék esetén, azonos kezelési koncentrációkat alkalmazva [89]. A felvett cink mennyiségében nem volt jelentős különbség, EPMA vizsgálatok  $\text{ZnO}$  részecskék jelenlétét mutatták ki az állat testében. Hao és munkatársai pontyban vizsgálták a nagyszemcsés és nano  $\text{ZnO}$  felvételét, a felvett cink mennyiségének és a toxicitás tekintetében is megelőzte a nano a nagyszemcsés formát [274]. Az oldott cink toxicitását elhanyagolható mértékűnek találták.

#### 5.3.2.5. Elemfelvételi vizsgálatok előzetesen elpusztított állatokban

Az 5.16. ábrán a kezeletlen; az élő,  $\text{CuSO}_4$ -oldattal kezelt; valamint az előzetesen elpusztított, majd  $\text{CuSO}_4$ -oldattal kezelt állatok réztartalma látható.



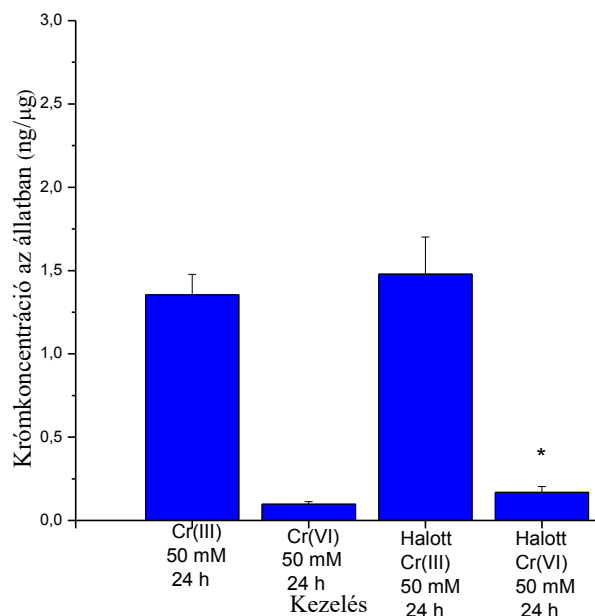
5.16. ábra: Élő és előzetesen elpusztított („halott”) állatok réztartalmának összehasonlítása

Az azonos kezelésnek kitett 4 mintasorozat (10 mmol/L  $\text{CuSO}_4$ -oldat, 24 h, 1 a kezelés megkezdése előtt élő és 3 halott) esetén minden párosításra elvégeztem a kétmintás t-próbát szignifikáns különbséget egyik esetben sem tapasztaltam ( $P < 0,05$ ). Ez azt jelenti, hogy a rézfelvétel az élő és előzetesen elpusztított állatok esetén hasonló mértékű, bár a 10 mmol/L



koncentrációjú oldat már elég toxikus a vizsgált faj egyedei számára, az 5.3.2.2 fejezetben ismertetett kísérletek során már kisebb koncentrációknál is jelentős volt az állatok elpusztulása a 24 órás kísérlet során. Tehát az itt bemutatott hasonlóság lehetséges, hogy abból ered, hogy mindkét (élő és előzetesen elpusztított) esetben elpusztult állat rézfelvételét tapasztaljuk. Az 5.3.2.2. fejezetben ismertetett rézfelvételi kísérleteim során a kezelési idő minden esetben 24 óra volt, az összehasonlíthatóság érdekében, de későbbi vizsgálatoknál (pl. az élő állatok által felvett réz mennyiségének vizsgálata során) ezt érdemes figyelembe venni. A grafikonon feltüntettem az 1 mol/L koncentrációjú  $\text{CuSO}_4$ -oldattal kezelt állat rézkoncentrációját is, mert ezt a korábbiakban nem vizsgáltam. Ebben az esetben a kezelés kb. 10 percig tartott, az állatot rögtön annak elpusztulása után kivettük az oldatból, majd vagy megmértük a réztartalmát a szokásos módon, vagy pedig újabb kezelésnek tettük ki az immár elpusztult állatot. Ezenkívül két további módszert is alkalmaztunk az állatok megölésére: hővel és forró formalinnal való kezelés. Ahogy fent említettem, a statisztikai próba eredménye alapján, nem volt szignifikáns eltérés a réztartalomban, tehát az ölés módja nem befolyásolja a passzív rézfelvételt.

Az 5.17. ábrán a  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ - illetve  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ -oldattal kezelt minták krómtartalma látható. Az eredményeket összehasonlítottam az 5.3.2.3. fejezetben ismertetett eredményekkel.

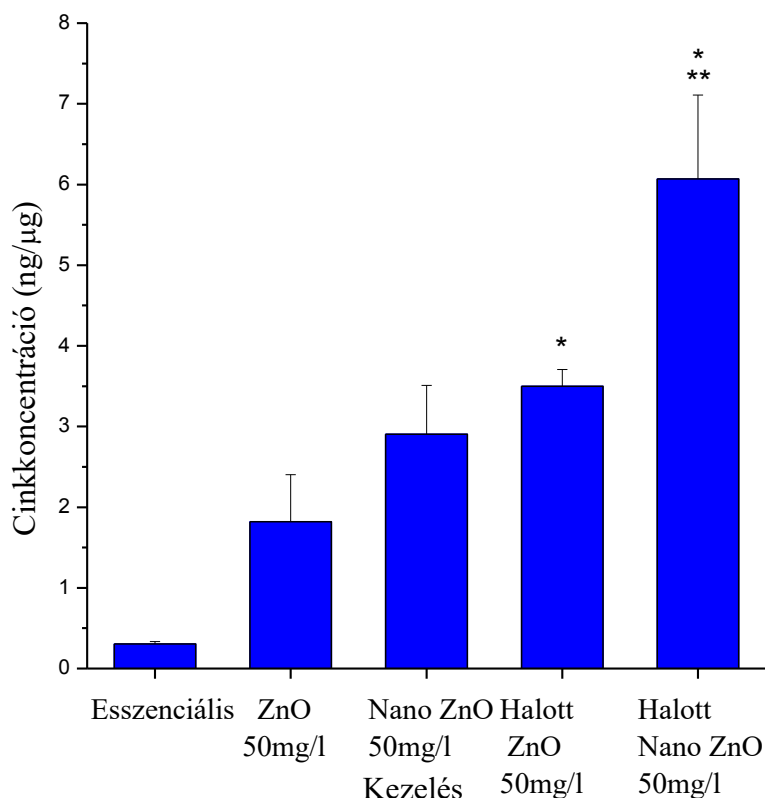


5.17. ábra: Élő és előzetesen elpusztított („halott”) állatok krómtartalmának összehasonlítása, \*: szignifikáns különbség a kezelés előtt élő és előzetesen elpusztított állatok krómtartalma közt,  $P < 0,05$

$K_2Cr(SO_4)_2$ -oldattal történő kezelés esetén hasonló megállapításokat tehetünk, mint a réznél, ebben az esetben sincs szignifikáns különbség a kezelés előtt még élő és előzetesen megölt, azonos kezelésnek kitett állatok krómtartalmában.  $K_2CrO_4$ -tal történő kezelés esetén azonban szignifikáns az eltérés, és az elpusztított állat krómfelvétele a nagyobb mértékű.

Ha az élő állatban nem szignifikánsan kisebb az elemfelvétel, az arra utalhat, hogy a felvétel inkább passzív, és azt nem akadályozza valamilyen biológiai folyamat. Chettri és munkatársai élő és elpusztított zuzmókban vizsgálták a réz, cink és ólom felvételét [275]. Cink esetén az élő szervezetben nagyobb volt a felvétel. A zuzmók elpusztítása forró víz segítségével történt, a folyamat során valószínűleg lecsökkent a cink-kötőhelyek száma. Srinath és munkatársai Cr(VI) felvételét vizsgálták élő és elpusztított kromát-rezisztens baktériumokban [276]. A halott egysejtűek esetén nagyobb volt a krómtartalom, bár ez valószínűleg annak volt köszönhető, hogy az elpusztított sejtek pH-ját beállították 2,5-re.

Az 5.18. ábrán tüntettem fel a ZnO-szuszpenziókkal kezelt élő és előzetesen elpusztított állatok cinktartalmát.



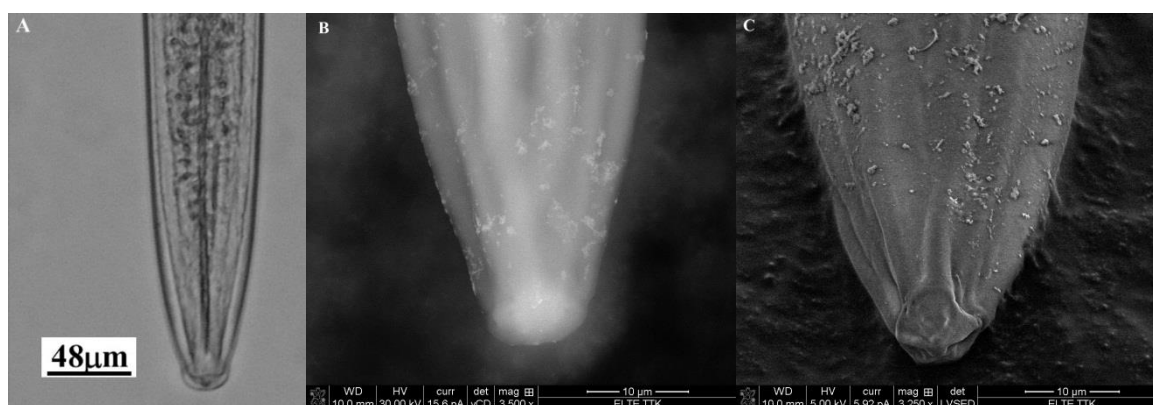
5.18. ábra: Élő és előzetesen elpusztított (halott) állatok cinktartalmának összehasonlítása, \*: szignifikáns különbség a kezelés előtt élő és előzetesen elpusztított állatok cinktartalma közt; \*\*: Szignifikáns eltérés a nano és nagyszemcsés formával történő kezelés között,  $P < 0,05$

Szignifikáns különbséget tapasztaltam mind a nagyszemcsés, mind pedig a nano forma esetén az élő és előzetesen elpusztított, kezelésnek kitett állatok cinktartalma között. Mindkét esetben az utóbbi minták elemfelvétele volt az intenzívebb. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy az élő állatban valamilyen folyamatok gátolják a felvételt. Lehetséges továbbá az is, hogy az állat le is tudja adni a felvett részecskéket, ahogy ezt leírták *C. elegans* esetén [263]. Az előzetesen elpusztított állatok esetén a nagyszemcsés és nano formákkal kezelt minták cinktartalma közt is szignifikáns a különbség, ebben az esetben a nano ZnO-szuszpenzióval kezelt állatok cinktartalma a nagyobb. Ezt a különbséget élő állatok esetén nem tapasztaltam.

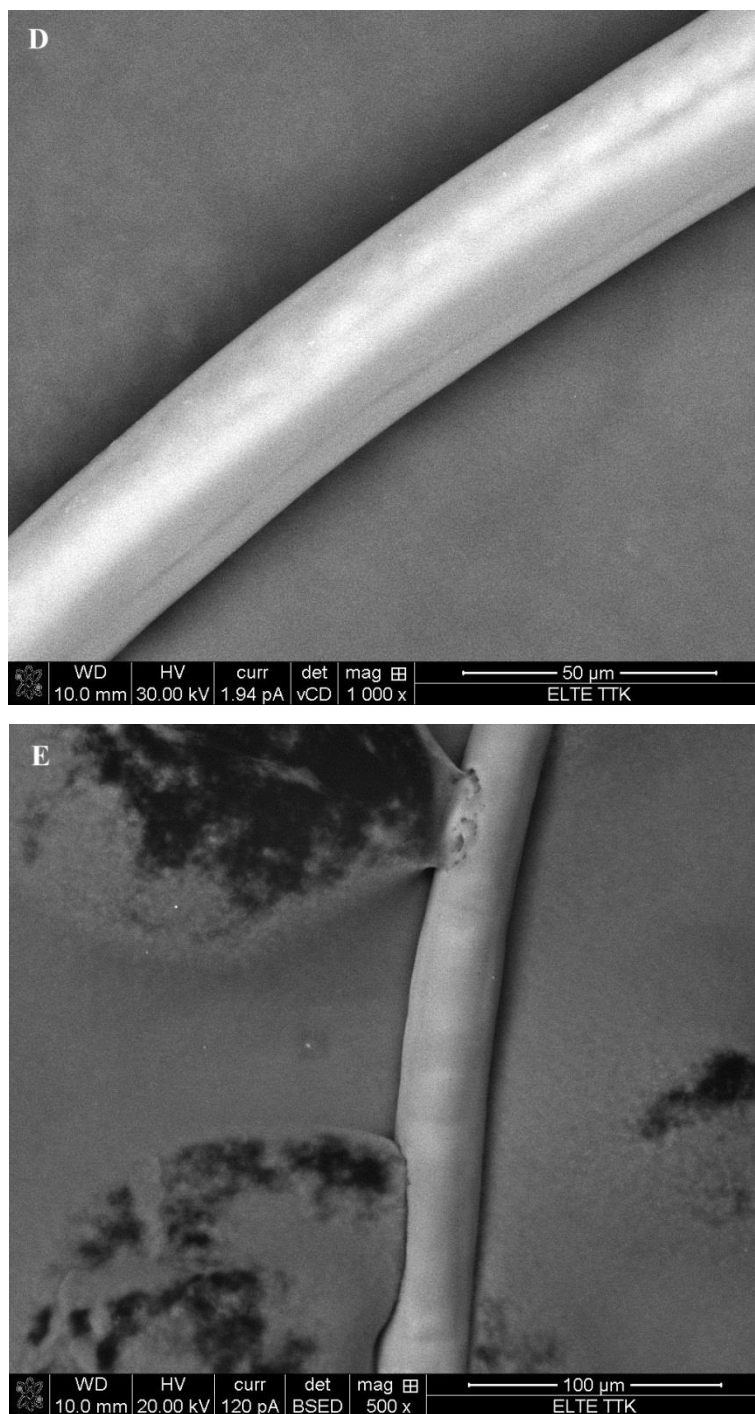
## 5.4. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

### 5.4.1 Az alkalmazott mintaelőkészítési módszer vizsgálata

A 2.3.2.4. fejezetben ismertetett mintaelőkészítési módszerek közül a gyorsfagyasztást követő liofilizálás viszonylag kényelmes, nagy előnye, hogy a minta elszennyezésének esélye csekély, hiszen az nem kerül közvetlen kapcsolatba vegyszerrel. Munkám során vizsgáltam a módszer alkalmazhatóságát fonálféreg mikroanalitikai vizsgálata esetén. Az 5.19. ábrán összehasonlítottam a természetes állapotban lévő fonálférget (fénymikroszkópos felvétel, A), valamint a nem liofilizált (SEM kép, B és D) és a liofilizált állatot (SEM kép, C és E). Látható, hogy a nagyvákuum nem változtatja meg az állat struktúráját (A és B), ezért a liofilizált és nem liofilizált állatok összehasonlíthatók SEM vizsgálatokkal. Összehasonlítva ezeket (B és C; illetve D és E), megállapítható, hogy a liofilizálás nem változtatja meg jelentősen az állat struktúráját.

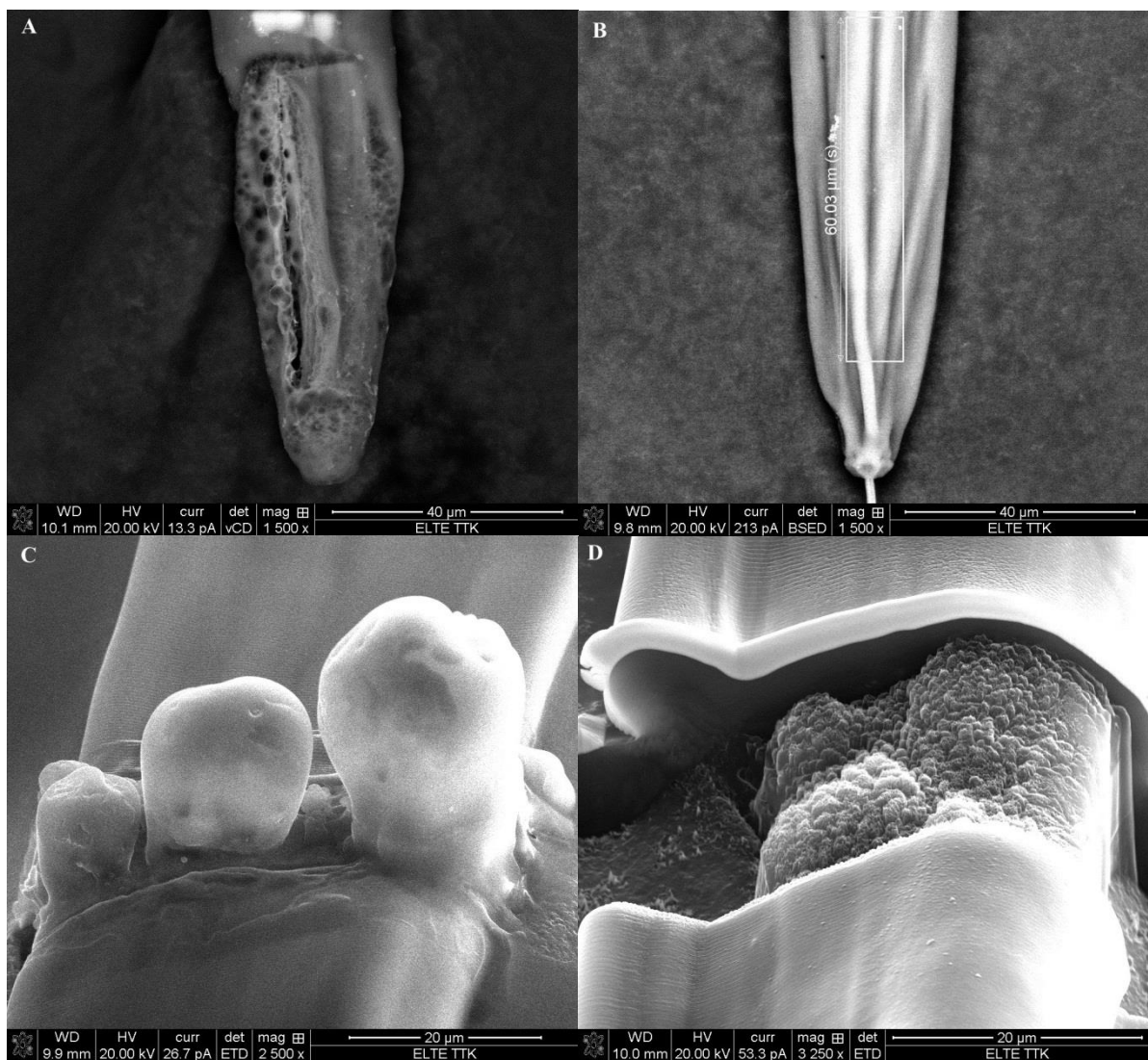


5.19. ábra: Fonálféreg fejének fénymikroszkópos (A), valamint SEM képe, nem liofilizált (B) és liofilizált minta (C) esetén



5.19. ábra (folytatás): Fonálféreg SEM képe a testközép tájékán nem liofilizált (D) és liofilizált (E) minta esetén

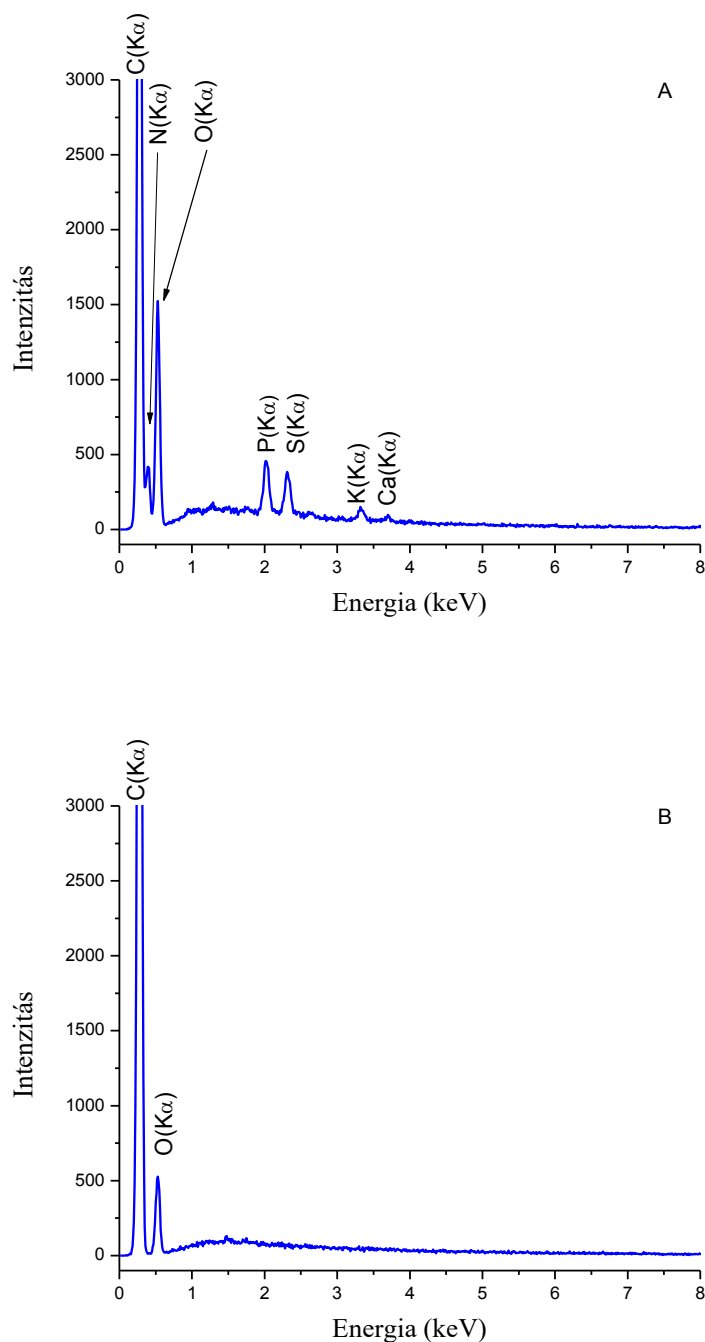
A gyorsfagyasztást követő liofilizálás tehát megfelelő mintaelőkészítési módszer a struktúra megőrzése szempontjából. Tanulmányoztam nagyintenzitású elektron- és ionnyaláb mintára kifejtett hatását. Összehasonlításképpen vizsgáltam a nem liofilizált mintát is (5.20. ábra).



5.20. ábra: Fonálféreg fejének SEM képe elektronnyalábbal történő besugárzás után (A: nem liofilizált, B liofilizált, a fehér téglalap a besugárzott területet mutatja), testközepének képe  $\text{Ga}^+$ -ionokkal történő bombázás után (C: nem liofilizált, D: liofilizált)

Az elektronnyalábbal történő besugárzás után a liofilizált mintán gyakorlatilag nem látható különbség (B), a nem liofilizált minta viszont jelentős mértékben roncsolódott (A). A  $\text{Ga}^+$ -ionokkal történő besugárzás során a liofilizált minta esetén jelentős mértékű a gázképződés (C), a minta felfúvódik, ez megakadályozza keresztmetszet készítését. A keresztmetszet mérete is megváltozik, hiszen anyag távozik a belsőbb régiókból. A liofilizált minta esetén jelentős gázképződés nem tapasztalható (D), az eltávolítani kívánt anyag „lebontása” folyamatos, a platinaréteg alatt viszonylag sima és tiszta keresztmetszeteket kapunk, mely tovább tisztítható kisebb ion-áramerősségeket alkalmazva. EPMA vizsgálataim során liofilizált mintákat tanulmányoztam ugyanolyan besugárzási paraméterekkel, melyeket

ezeknél a vizsgálatoknál alkalmaztam. A gyorsfagyasztást követő liofilizálás tehát megfelelő mintaelőkészítési módszer mind EPMA vizsgálatok végzése, mind pedig keresztmetszetek készítése során. A mintaelőkészítési lépés azonban nem hagyható ki, nem liofilizált minták esetén az említett vizsgálatokat nem lehet megbízhatóan elvégezni. Az 5.21. A ábrán egy kezeletlen, liofilizált fonálféreg-minta röntgenspektruma látható, melyet az állat testének közepénél vettem fel, a B ábra az üres mintahordozó spektrumát mutatja összehasonlításképpen.

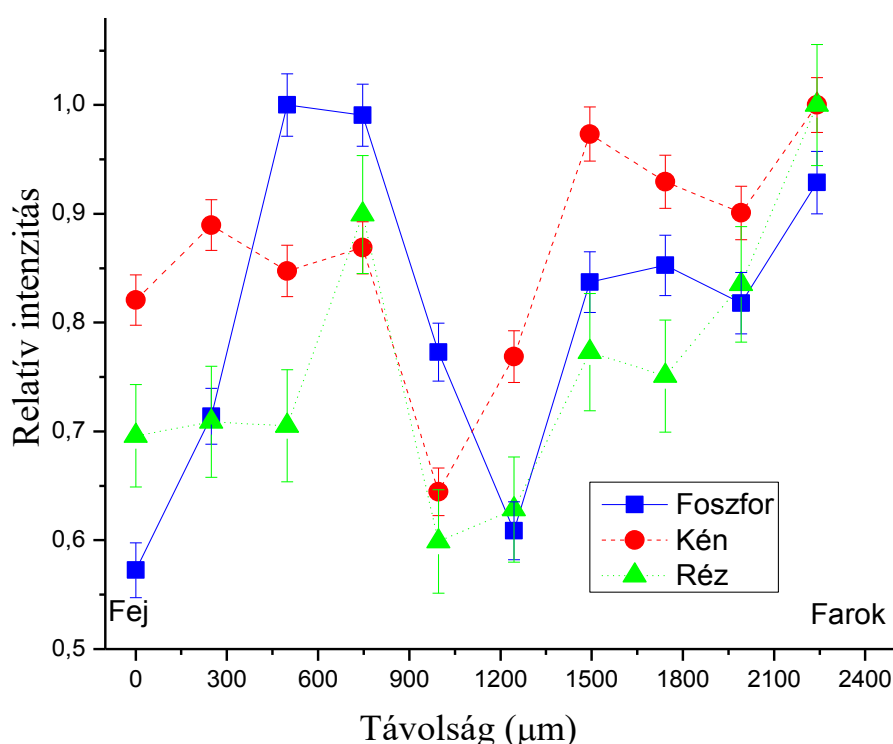


5.21. ábra: Kezeletlen állat (teste közepénél, A) és a mintahordozó röntgenspektruma (B)

## 5.4.2. Rézfelvétel vizsgálata EPMA módszerrel

### 5.4.2.1. Elemeloszlási vizsgálatok a kutikulában

Röntgenspektrumokat vettem fel az állat testhossza mentén 10 pontban, az állat testfelületének jelentős részét lefedve. Figyelembe véve a vizsgált faj kutikulájának vastagságát és az EPMA módszer analitikai mélységét, elmondható, hogy ezzel a módszerrel a vizsgált elemek kutikulában lévő hosszirányú eloszlásáról kapunk információt. Az 5.22. ábra a vizsgálat eredményét mutatja.



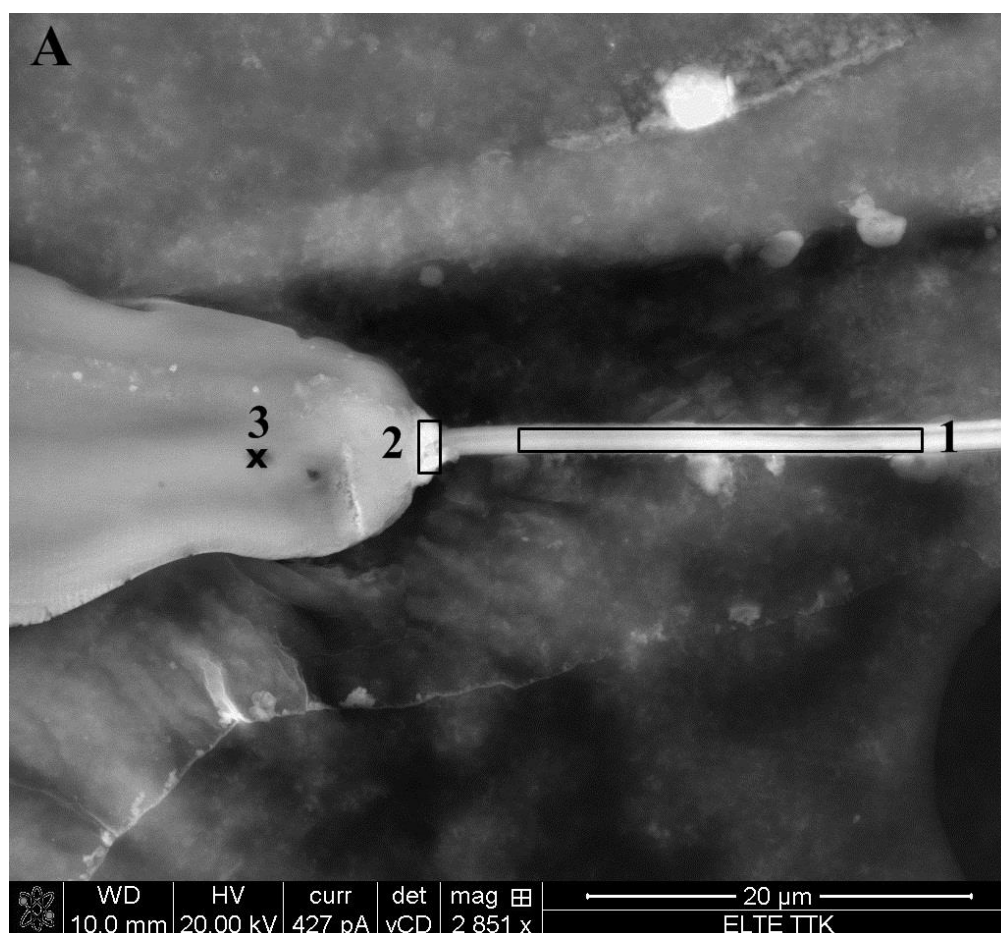
5.22. ábra: A foszfor, kén és réz hosszmenti eloszlása az állat kutikulájában (1 mmol/L  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -oldattal történő kezelés, 24 óra)

Foszfor esetén a maximális intenzitást a test első harmadának vége felé találjuk, míg kén és réz esetén a farokban. A foszfor eloszlási képe ennek megfelelően kissé eltér a másik két elemétől. A kén és réz eloszlása azonban jól korrelál, 0,762 a lineáris korrelációs koefficiens ( $P < 0,05$ ). Howell tengeri fonálférgek vizsgálata során megállapította, hogy a réz és cink felvételében a kutikulának fontos szerep jut. Állítása szerint a fonálférgek külső felszínének

töltöttsége negatív a diszulfid- és szulfhidril-csoportok miatt, a negatív töltés a farok felé növekszik, a farok elemfelvételben betöltött szerepét is megemlíti [251]. Az általam mért elemeloszlás megfelel ezen megállapításoknak, a kén és a réz intenzitása is a farok felé növekszik, a korreláció pedig annak tudható be, hogy a kutikulában lévő, fent említett kéntartalmú csoportok fontos szerepet játszanak a réz megkötésében.

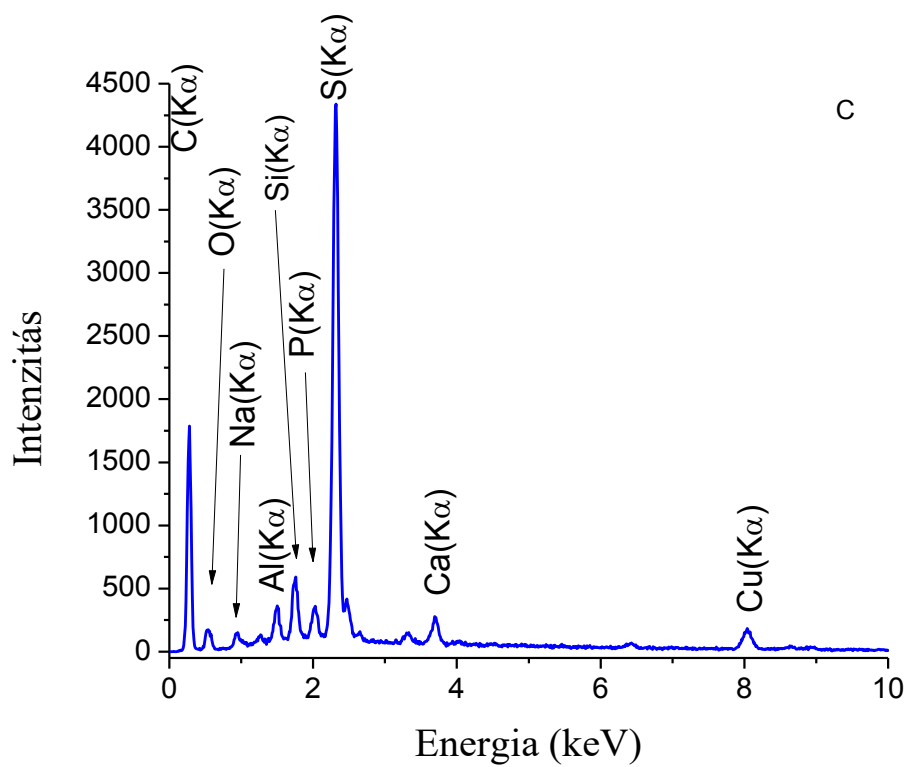
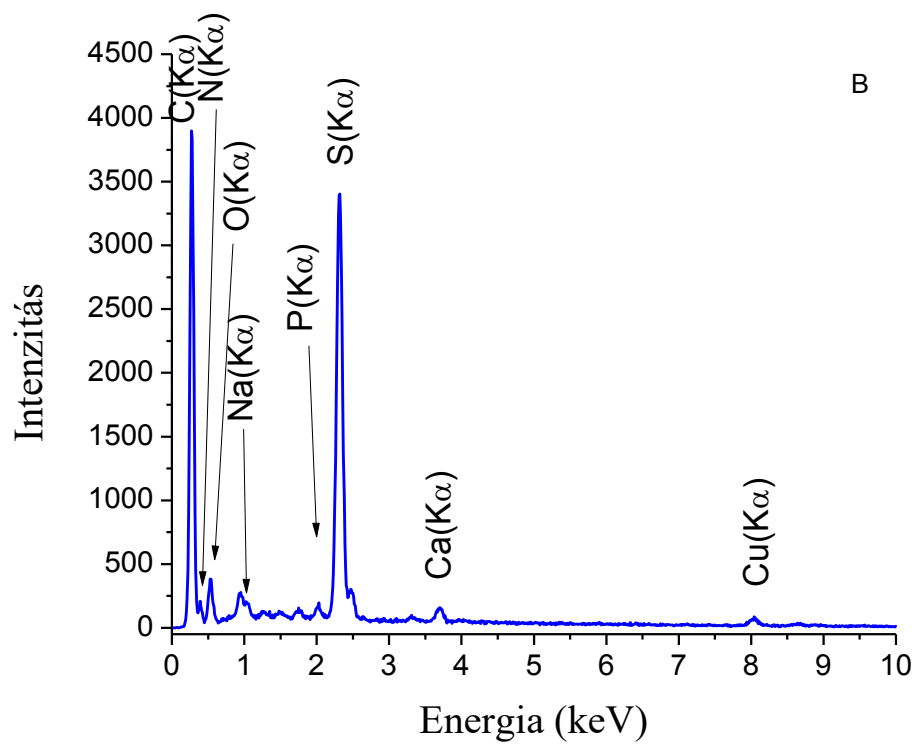
#### 5.4.2.2. Elemeloszlási vizsgálatok a szájszuronyban, az ajakban és a fej környékén

Vizsgáltam az állat fejének környékét EPMA módszerrel. Olyan állatot választottam, melynek a kezelés után a szájszuronya kieresztett állapotban volt. A szájszurony vastagsága 1  $\mu\text{m}$  körüli, így az jól vizsgálható EPMA módszerrel. A többi vizsgálati helyen a korábban elmondottak érvényesek: a kutikula elemtartalmáról jutunk információhoz. Az 5.23. ábrán három különböző pontban felvett spektrumot láthatunk, míg az 5.24. ábra az állatban található elemek eloszlását mutatja.

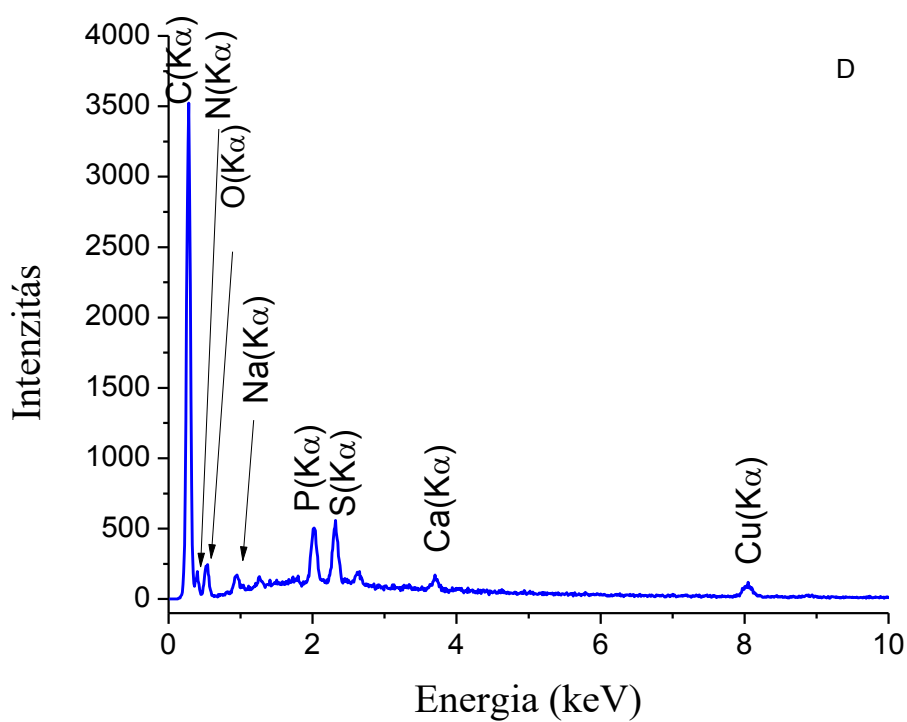


5.23. ábra: EPMA vizsgálatok rézzel kezelt állatban (1mmol/L  $\text{CuSO}_4$ -oldat, 24 óra), A: a vizsgált helyek, 1: szájszurony, 2: ajak, 3: fej

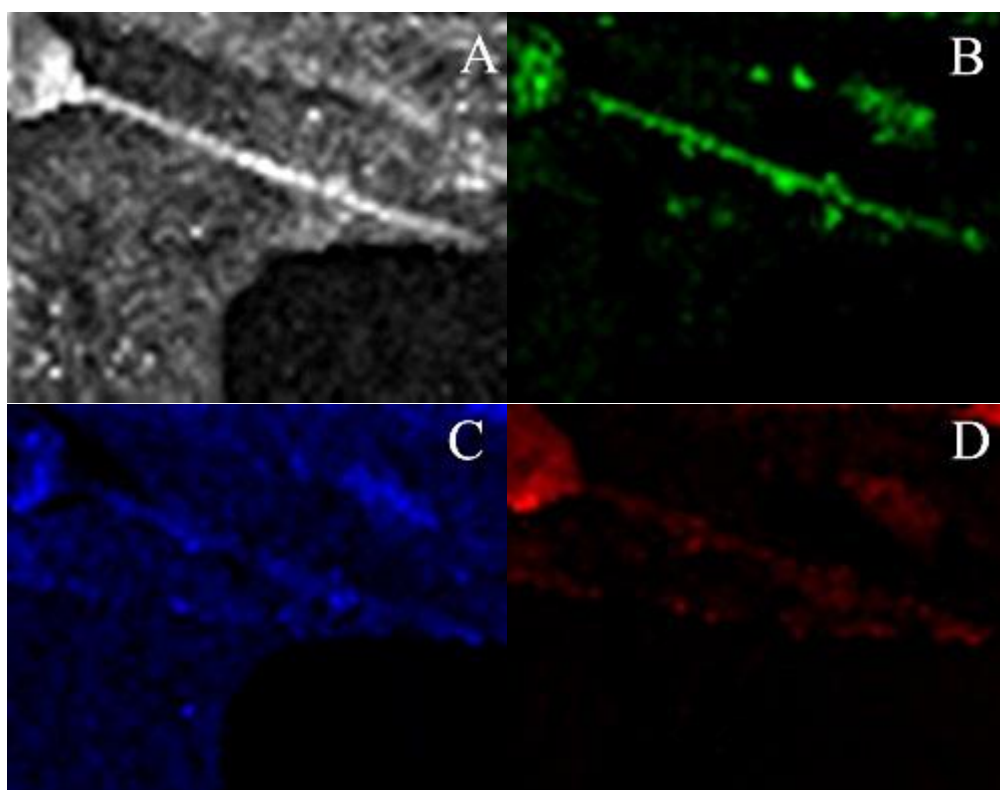




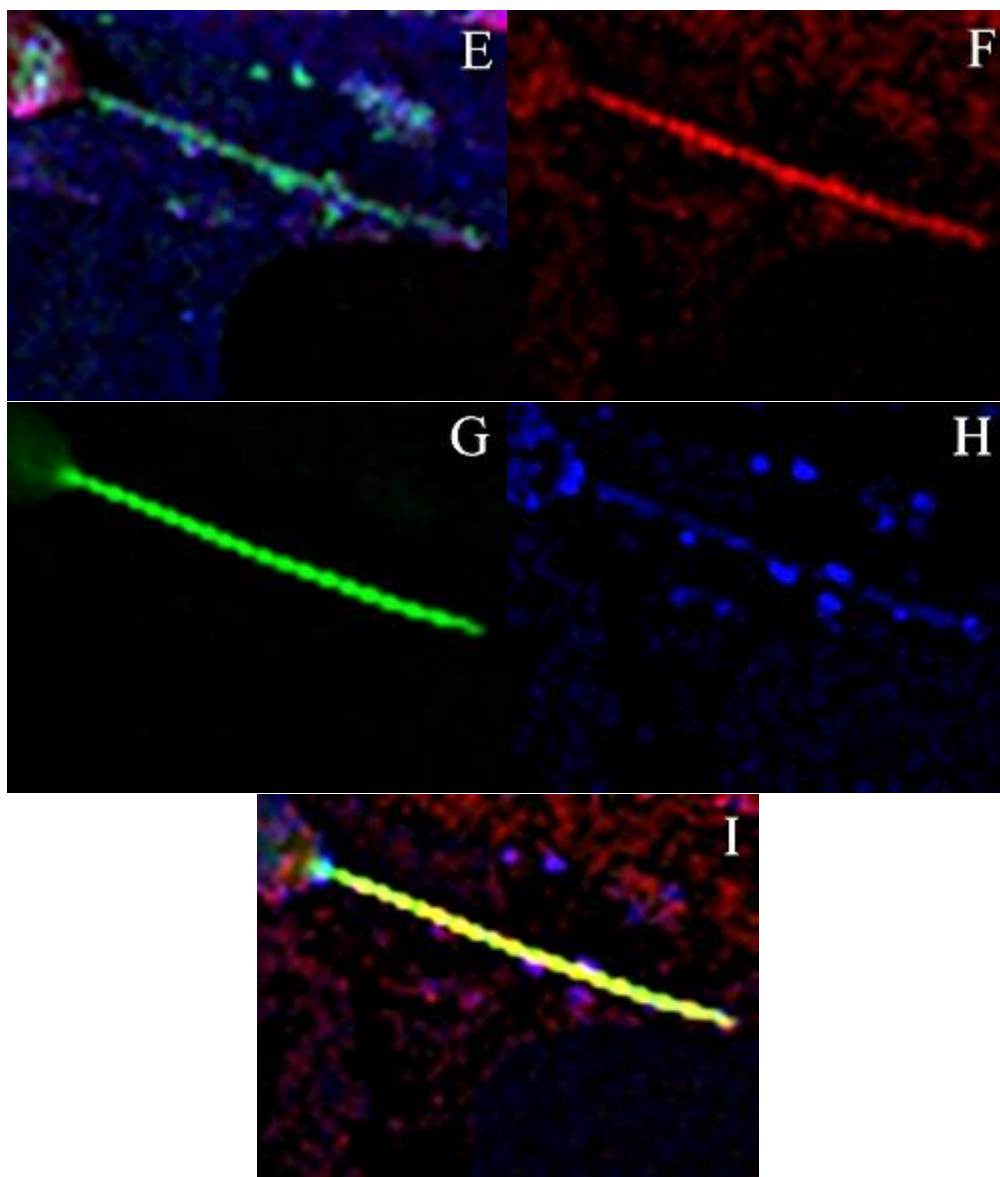
5.23. ábra (folytatás): Az állat szájszervében (B) és ajkában (C) felvett röntgenspektrumok



5.23. ábra (folytatás): Az állat fejében (D) felvett röntgenspektrum



5.24. ábra: Elemeloszlási képek az állat száj szervében és fejénél: SEM kép (A); nitrogén (B), oxigén (C) és foszfor (D) eloszlása



5.24. ábra (folytatás): Elemeloszlási képek az állat szájszervében és fejénél: B, C és D képek összege (E); nátrium (F), kén (G) és réz (H) eloszlása, F, G és H képek összege (I)

Ezek alapján megállapítható, hogy a szájszerv és az ajak kémiai összetétele lényegesen eltér az állat többi részében tapasztalttól. Az állat kutikulájában (5.21. A és 5.23. D ábrák) a foszfor és kén intenzitása összemérhető egymással, a széné pedig lényegesen nagyobb náluk. A szájszervben és az ajakban lényegesen nagyobb a kén mennyisége, az ajakban a legnagyobb. A réz intenzitása lényegesen nagyobb az ajakban, mint a másik két helyen. A szájszervben meglehetősen nagy a nátrium intenzitása is, a másik két vizsgált helyhez képest. Az állat ajkáról felvett spektrumban a szilícium és alumínium jele is megjelenik, ráadásul a foszforral összemérhető intenzitással. Ezek az elemek nagy valószínűség szerint a talajból származnak, és az általam alkalmazott Milli-Q vízben történő mosással nem távolíthatók el teljesen.

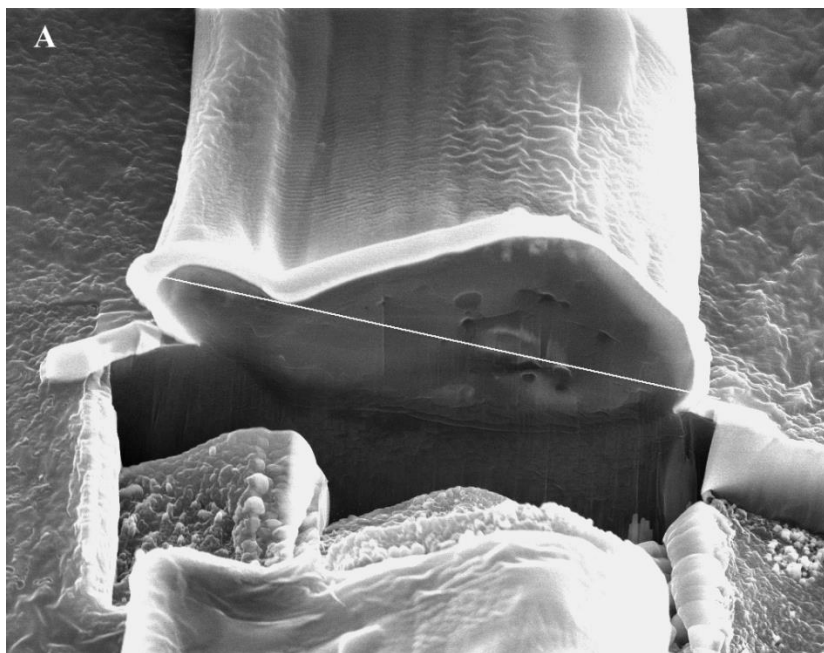
Valószínűleg jellegzetes mozgása következtében az állat ezen része jobban szennyeződik és a szennyezés nehezebben is távolítható el innen.

Korrelációs elemtérképek készítése során úgy járunk el, hogy két vagy három egyszínű képet összeadunk. A képeknek piros, kék vagy zöld színűnek kell lenniük (szubtraktív színkeverés alapszínei), az összeadás után abban a pontban, ahol több szín is jelen volt (tehát több elem is megtalálható), ott keverékszíneket kapunk, például piros és zöld összeadása esetén sárgát. Ezek alapján elmondható, hogy a nitrogén, oxigén és foszfor elemek közül a szájszervben a nitrogén dominál. A nátrium, kén és réz elemek közül a szájszervben a nátrium és a kén a domináns, az ajakban a réz és a kén. Ez megerősíti a kutikula vizsgálata során tapasztaltakat, a réz a kutikulában valószínűleg erősen kötődik kéntartalmú vegyületekhez, a szájszervben – annak ellenére, hogy annak kéntartalma meglehetősen nagy – ez nem jellemző.

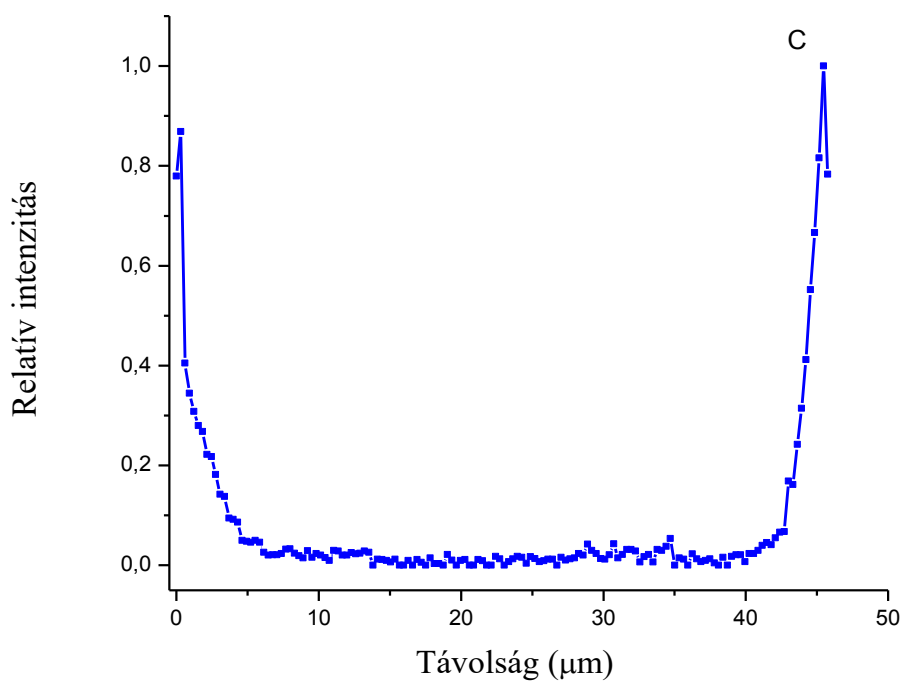
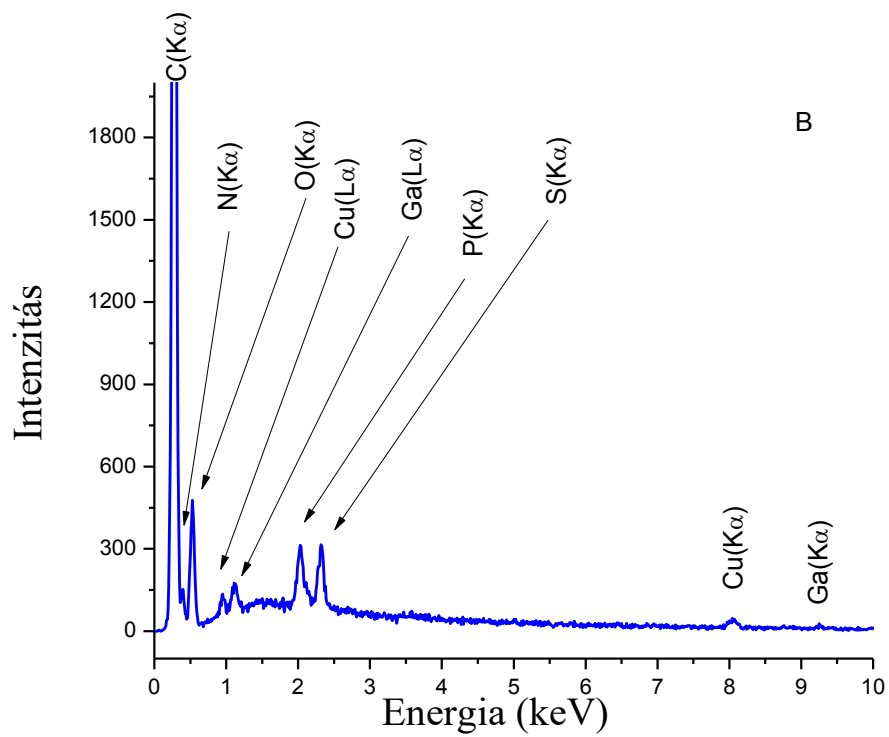
### 5.4.3. Keresztmetszeti vizsgálatok

#### 5.4.3.1. Keresztmetszetek létrehozása FIB technikával

Ahogy az 5.4.1. fejezetben említettem, az alkalmazott mintaelőkészítési módszer alkalmas sima keresztmetszetek létrehozására. Az 5.25. ábra egy rézzel kezelt állat testközép környékén készített keresztmetszetét (A), a keresztmetszetben felvett spektrumot (B) (a keresztmetszet nagy részét vizsgáltuk, de a platinabevonatot kihagytuk a mért területből) és a platina eloszlását (C) mutatja az A ábrán jelölt fehér vonal mentén.



5.25. ábra: Rézzel kezelt állat (1 mmol/L  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -oldat, 24 óra) keresztmetszete testének közepe környékén

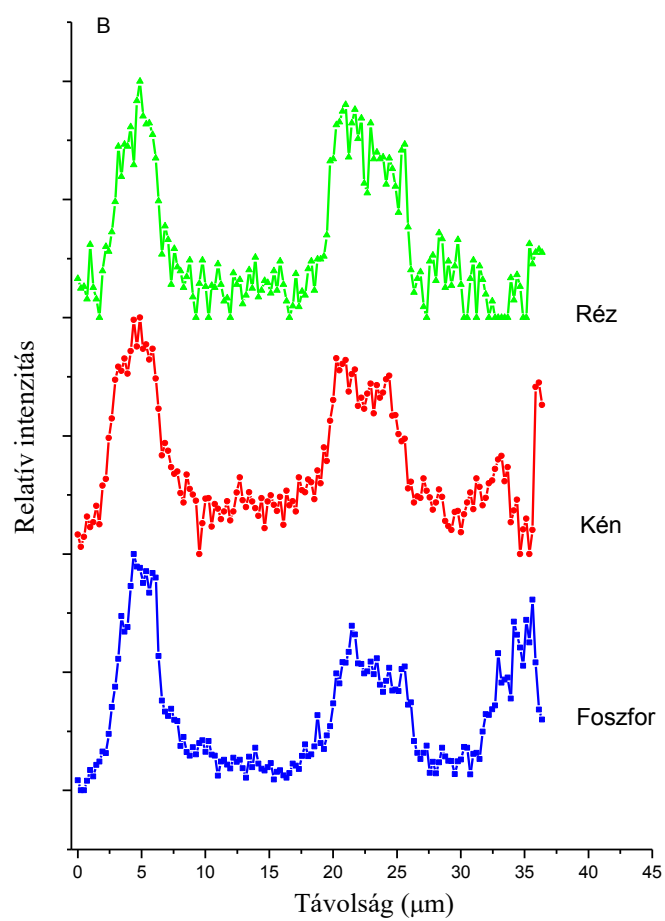
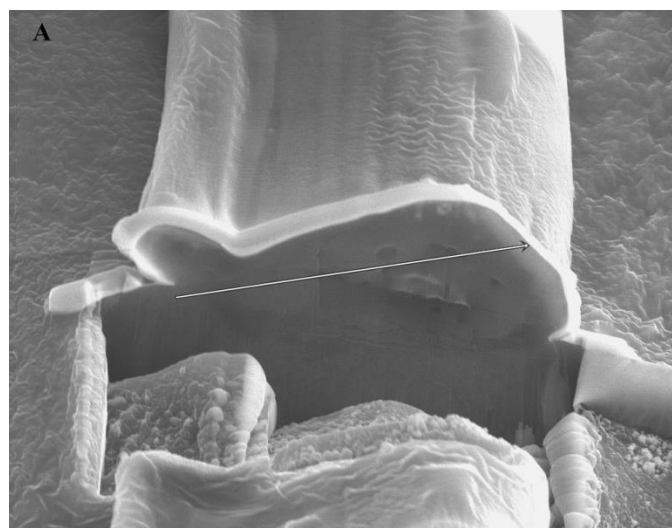


5.25. ábra (folytatás): A keresztmetszetben felvett röntgenspektrum (B) és a platina eloszlása az A ábrán jelölt fehér vonal mentén (C)

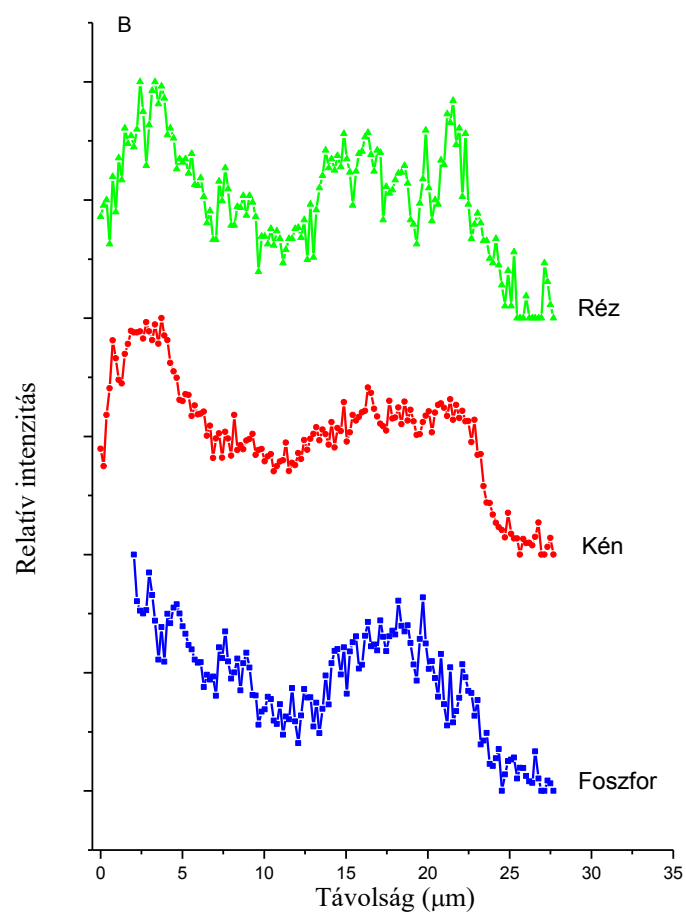
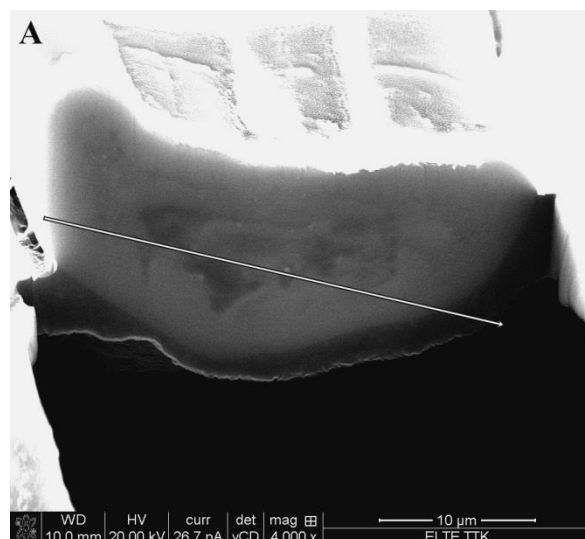
Látható, hogy a platínával nem bevont területen kicsit sérül az állat, ezért ajánlott a platínával való bevonás a metszet készítése előtt. Ettől egy esetben tekintettünk el, a  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -tal kezelt állat farkánál készített keresztmetszetről, ekkor ugyanis a minta alakja lehetetlenné tette homogén platinafelület kialakítását. A keresztmetszetben felvett spektrum azt mutatja, hogy kis galliumszennyezés van ugyan, de K és L vonalai nem zavarják semelyik vizsgálandó elem mérését (Minden vizsgálandó elem eloszlását K vonaluk alapján határozzuk meg). A platina M vonala zavarja a foszfor K vonalon történő meghatározását, de amint az 5.25. C ábrán látható, csak azokon a területeken mérhető jelentős mennyiségű platina, ahol a bevonat van. A kísérleti részben említettem, hogy ezeket a pontokat kihagytam a foszfor egydimenziós elemeloszlási képéből.

#### 5.4.3.2. Elemeloszlási vizsgálatok a keresztmetszetekben

Két különböző helyen készítettünk keresztmetszetet az 1 mmol/L koncentrációjú  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -oldattal 24 óráig kezelt állaton: testközepének környékén (5.26. ábra) és a farkánál (5.27. ábra). Utóbbi esetben úgy jártunk el, hogy az állat farkának egy részét eltávolítottuk FIB technika segítségével, majd a kapott keresztmetszetet vizsgáltuk. A faroknál létrehozott keresztmetszet esetén a réz eloszlása lokális maximumot mutat a vonal két végénél, vagyis a kutikula környékén. A testközépi keresztmetszet esetén a második lokális maximum egy kicsit korábban jelentkezik, a foszfor és kén esetén ebben a keresztmetszetben három lokális maximum figyelhető meg. A króm eloszlása is hasonló képet mutat (5.28. ábra). Az 5.29. A ábrán a nano ZnO-dal kezelt állat testének elülső felének SEM képe látható, az állat külső felszínén nem látszanak szemcsék, tehát a mosás megfelelő volt, és a TXRF mérés eredményeit is figyelembe véve megállapítható, hogy az állat vesz fel nano ZnO-t. A cink eloszlása is hasonló képet mutat, mint a réz és a krómé. Ezek alapján mindhárom elem esetén kijelenthető, hogy a fő elemfelvételi utat a kutikula jelenti. A három elem kémiai formája eltérő volt (kation, anion és nanorészecske). Howell tengeri fonálférgek esetén azt találta, hogy cink és réz esetén az elemfelvétel főként a kutikulán keresztül történik [256]. Jackson és munkatársai *C. elegans* rézfelvétele esetén megállapították, hogy az elemfelvétel a bélrendszeren keresztül megy végbe. A vizsgálatok során SXRF módszerrel végeztek elemtérképezést. Ebben az esetben a háromdimenziós eloszlás kétdimenziós leképezését kapjuk, hiszen az analitikai mélység jóval nagyobb a vizsgált állat vastagságánál. Az állat alakja nem szabályos henger, a széleinél kissé megnyúlt, így ezen a részen kisebb intenzitásokat kapunk, azonos elemtartalom esetén.

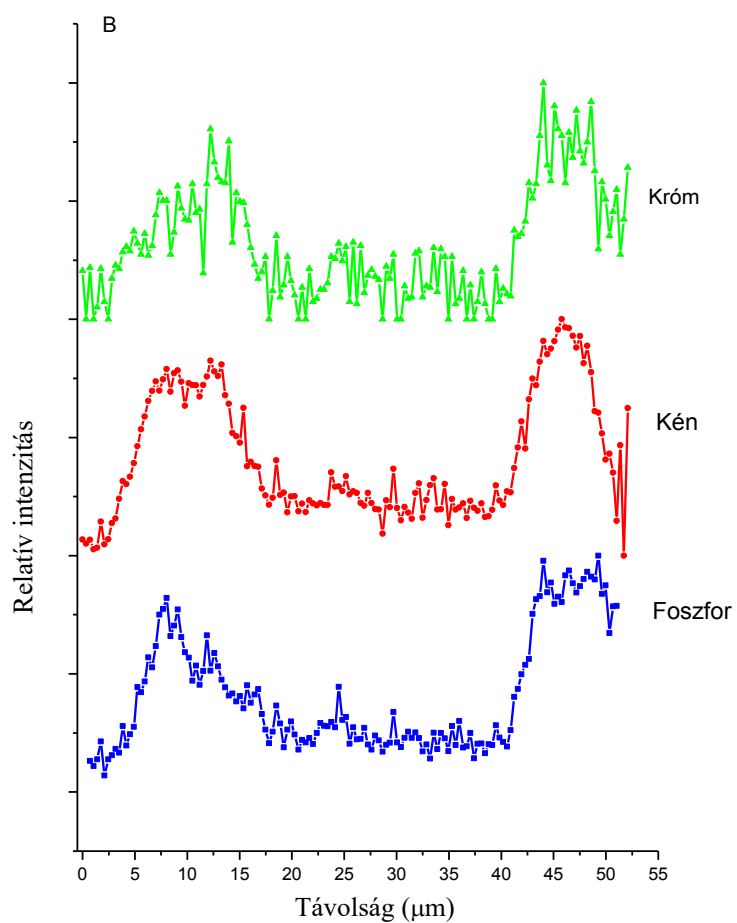
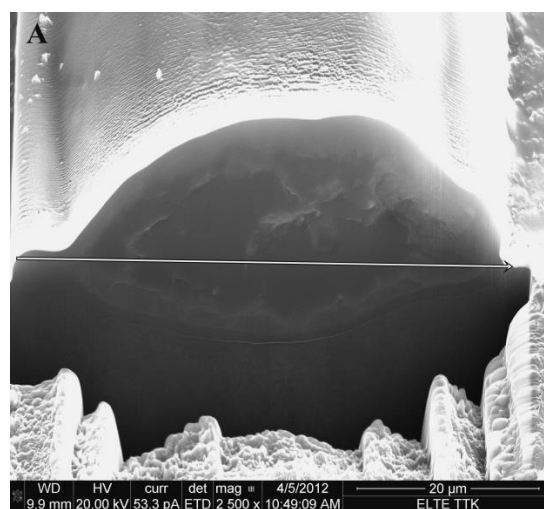


5.26. ábra: Rézzel kezelt fonálféreg (1 mmol/L  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -oldat, 24 óra) keresztmetszete a test közepénél (A); foszfor, kén és réz eloszlása az A ábrán jelölt vonal mentén (B)

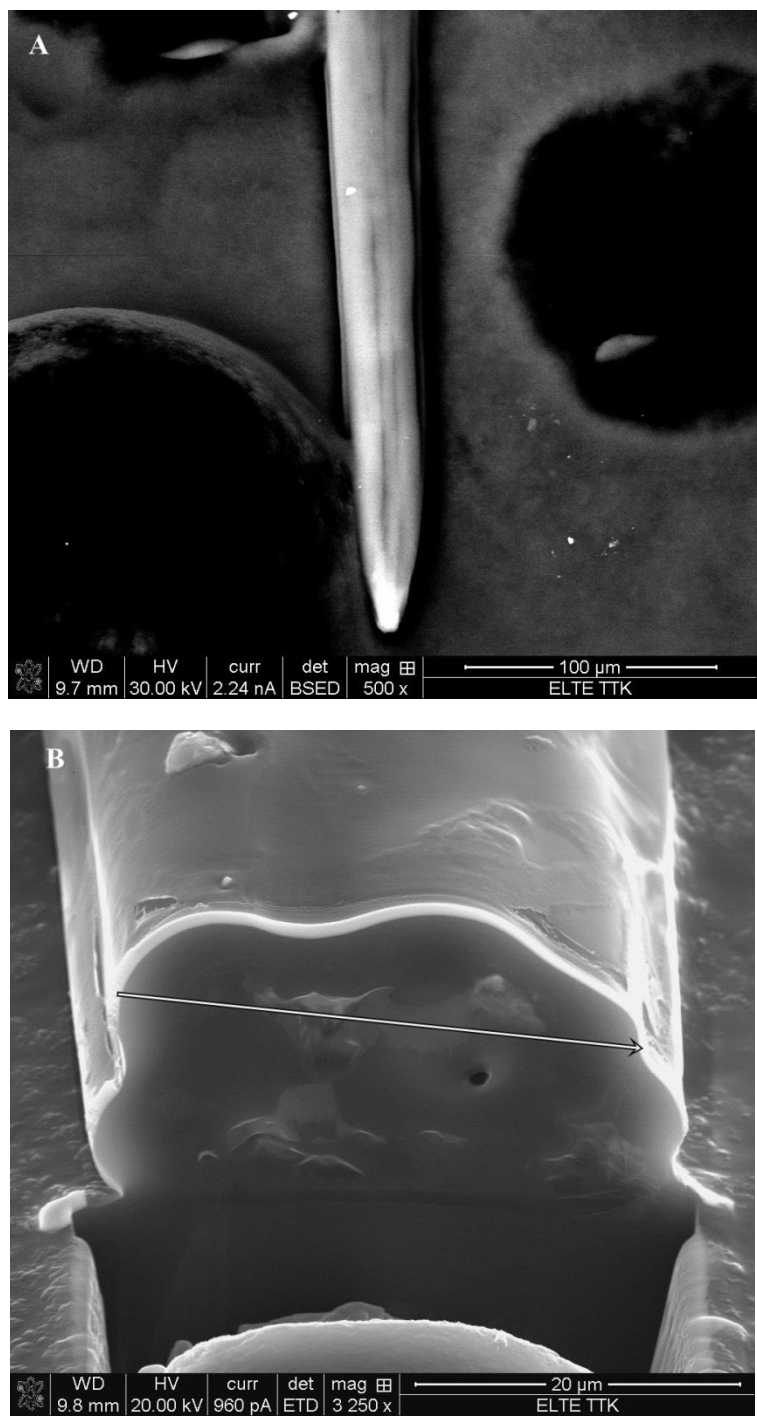


5.27. ábra: Rézzel kezelt fonálféreg (1 mmol/L  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -oldat, 24 óra) keresztmetszete a faroknál (A); foszfor, kén és réz eloszlása az A ábrán jelölt vonal mentén (B)

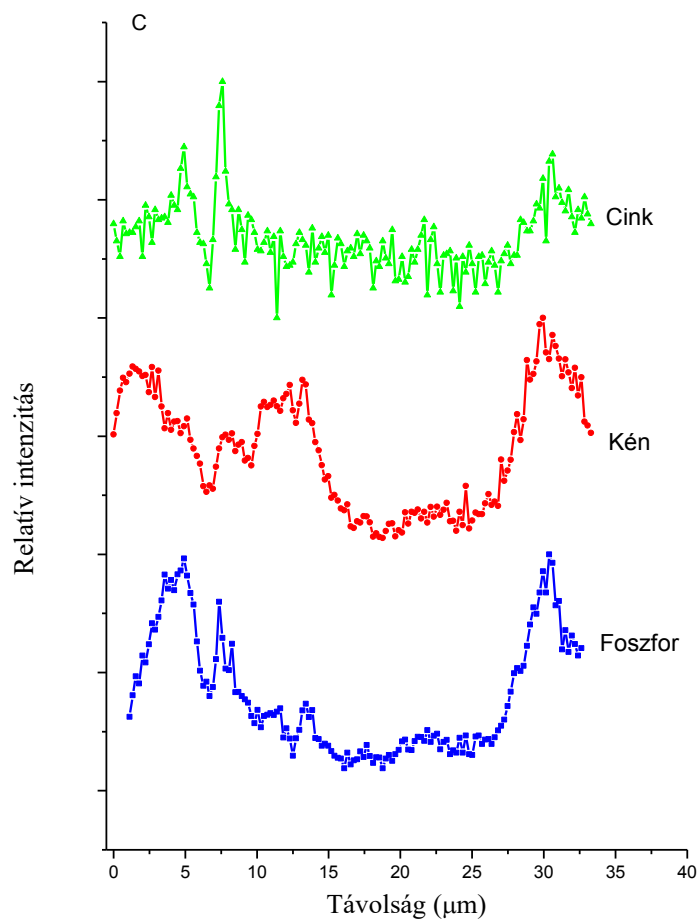




5.28. ábra: Krómmal kezelt fonálféreg (50 mmol/L  $K_2CrO_4$ -oldat, 24 óra) keresztmetszete a test közepénél (A); foszfor, kén és króm eloszlása az A ábrán jelölt vonal mentén (B)



5.29. ábra: Cinkkel kezelt fonálféreg (50 mg/L nano ZnO-szuszpenzió, 24 óra) elülső fele (A);  
keresztmetszete a test közepénél (B)



5.29. ábra (folytatás): Foszfor, kén és cink eloszlása az A ábrán jelölt vonal mentén (C)

Kezelés	Foszfor	Kén
1 mmol/L $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -oldat, 24 h (testközép)	0,699	0,862
1 mmol/L $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -oldat, 24 h (farok)	0,636	0,863
50 mmol/L $\text{K}_2\text{CrO}_4$ -oldat, 24 h (testközép)	0,797	0,861
50 mg/L nano ZnO- szuszpenzió, 24 h (testközép)	0,634	0,492

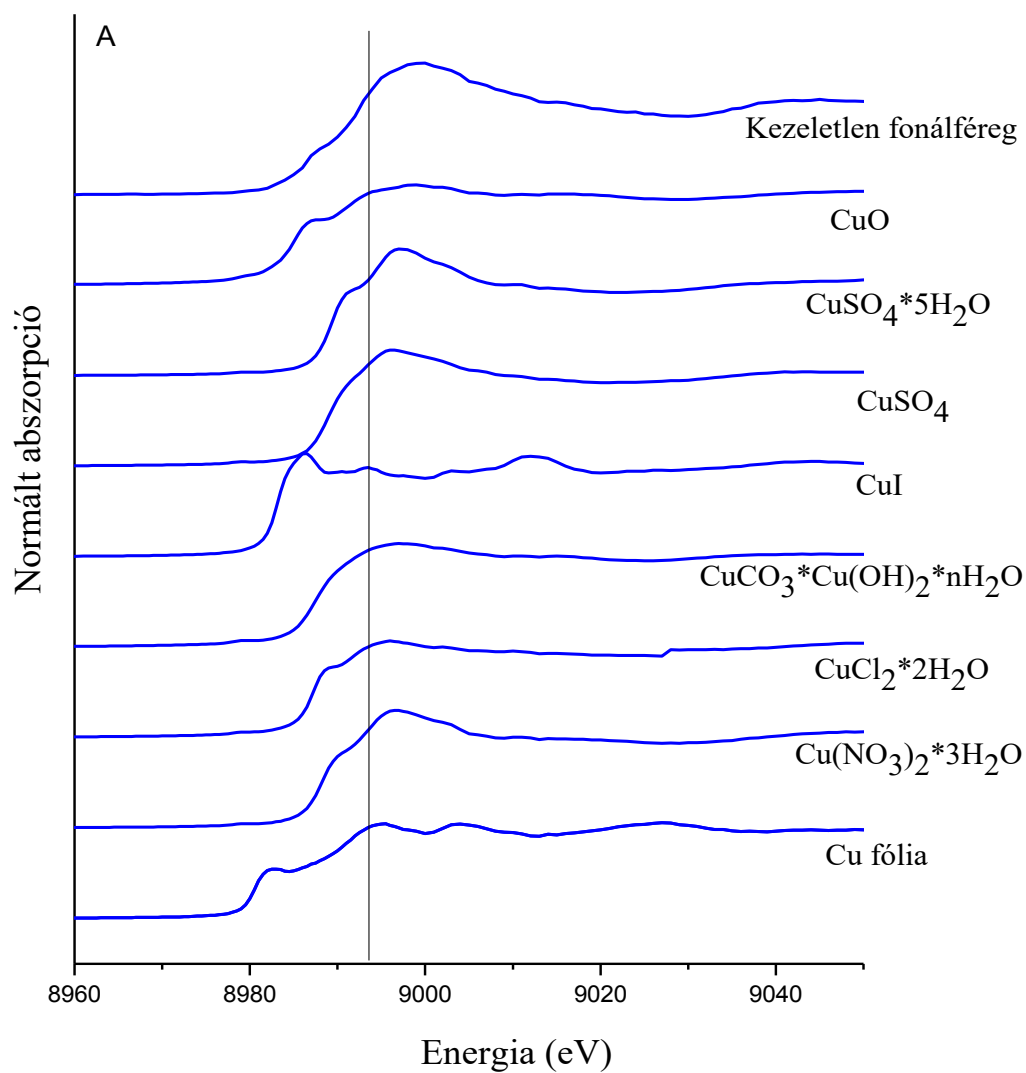
5.4. táblázat: A kezelőszerben lévő fém és a kén, illetve foszfor eloszlása közötti lineáris korrelációs együttható,  $P < 0,001$ , minden esetben

Az eloszlásokat lineáris korrelációs analízis segítségével hasonlítottam össze, ennek eredményét az 5.4. táblázatban foglaltam össze. Ezek alapján megállapítható, hogy a króm és mindkét vizsgált esszenciális elem eloszlása között szoros korreláció van. A króm fonálférgekben való eloszlásával kapcsolatos információt nem találtam az irodalomban. A Cr(VI) DNS károsító hatása jól ismert, Dillon és munkatársai a króm és foszfor kolokalizációját figyelték meg Cr(VI)-tal kezelt hörcsög tüdősejtekben [277]. Emlősejtekben a kromát redukciójában fontos szerepet játszik a glutation nevű, kéntartalmú vegyület [278]. A kapott korrelációk alapján hasonló folyamatok lejátszódása valószínűsíthető fonálférgekben. A réz eloszlása a kénével szoros a foszforéval gyengébb korrelációt mutat. A kén és réz eloszlása közti erős korreláció kéntartalmú vegyületek réz-detoxifikációban játszott szerepére utalhat. Cink esetén mindkét elemre gyenge a korreláció, de foszforra erősebb. Zeitoun-Ghandour ZnSO<sub>4</sub>-tal kezelt állatok XANES vizsgálata során megállapították, hogy a kezelt állat spektruma a Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-éra emlékeztetett [262]. Ez összhangban van az általam talált korrelációval.

## **5.5. XANES vizsgálatok**

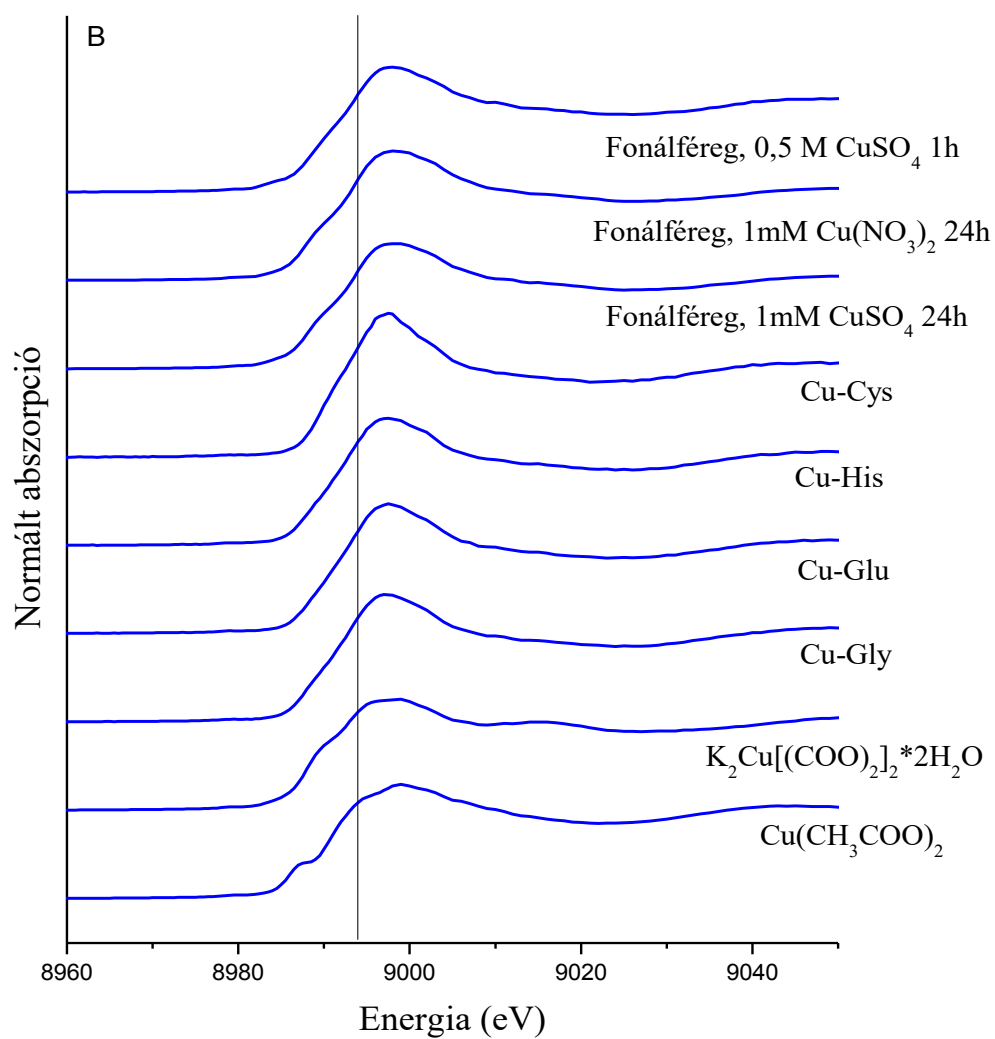
### **5.5.1. A réz kémiai környezetének vizsgálata**

XANES spektrometria segítségével vizsgáltam a réz kémiai környezetét mesterséges kezelésnek kitett és ki nem tett állatokban. Vizsgálataimat két mérőhelyen végeztem, a BAMline-nál végzett vizsgálatok során több referenciavegyületet és különböző kezeléseknek kitett és ki nem tett fonálférgeket vizsgáltam. Az itt nyert tapasztalatok alapján folytattam a vizsgálatokat a MySpot mérőhelyen. Az 5.30. ábrán a mért referenciavegyületek és fonálféreg-minták spektruma látható. Az 5.5. táblázatban – a réz oxidációs állapotának vizsgálata érdekében – a vizsgált vegyületek és minták K abszorpciós élének pozíciója látható, melyet az első inflexiós pont alapján határoztam meg. Ezek alapján megállapítható, hogy minden mintában a +2-es oxidációs állapotú réz dominál. Az egyes fonálféreg-minták XANES spektrumait összehasonlítva (5.31. ábra) megállapítható, hogy az alkalmazott kezelések esetén nincs lényeges különbség a spektrumokban. A kezeletlen állat XANES spektruma azonban eltérő. Mivel a felvett réz mennyisége jóval nagyobb, mint az esszenciálisan jelenlévőé, ebből arra következtethetünk, hogy a mesterségesen bevitt réz kémiai összetétele eltér az esszenciálisétól. Ennek megfelelően a MySpot mérőhelyen csak egy kezelt mintát és néhány referenciavegyületet vizsgáltunk tovább.



5.30. A ábra: Szervetlen referenciavegyületek és kezeletlen fonálféreg-minta XANES spektruma a BAMline mérőhelyen mérve, a függőleges fekete vonal a kezeletlen minta K abszorpciós élének pozícióját jelöli (8993 eV)

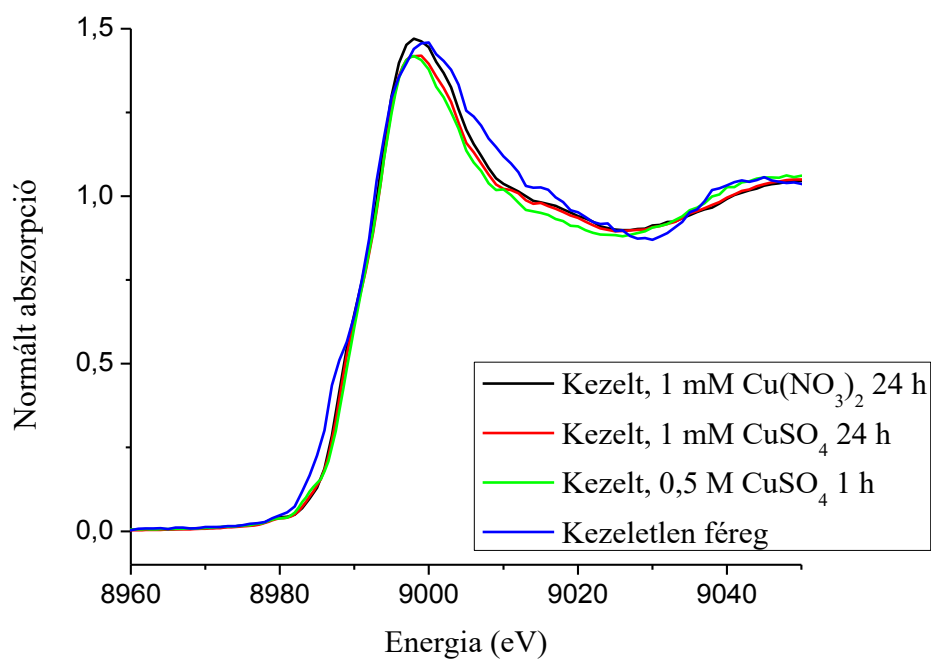
B



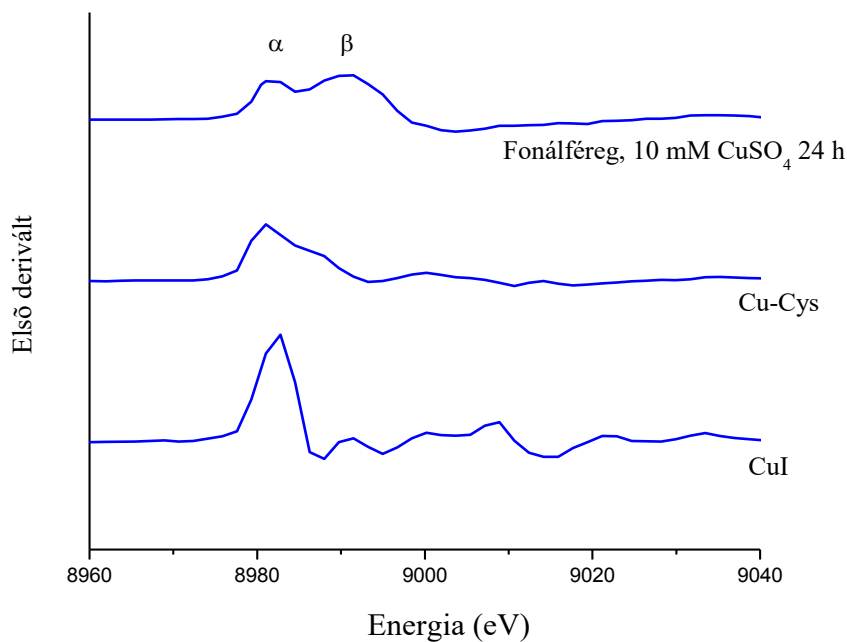
5.30. B ábra: Szerves referenciavegyületek és kezelt fonálféreg-minták XANES spektruma a BAMline mérőhelyen mérve, a függőleges fekete vonal a kezelt minták K abszorpciós élének pozícióját jelöli (8994 eV)

Minta	A réz K abszorpciós élének pozíciója (eV)
CuI (oxidációs szám: +1)	8983,5
CuO	8985
CuCl <sub>2</sub>	8987,5
CuCO <sub>3</sub> *Cu(OH) <sub>2</sub> *nH <sub>2</sub> O	8987,5
Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *3H <sub>2</sub> O	8988,5
CuSO <sub>4</sub>	8989,5
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	8989,5
K <sub>2</sub> Cu[(COO) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	8988
Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	8990,5
Cu-Cys	8990
Cu-His	8993
Cu-Gly	8983,5
Cu-Glu	8993,5
Kezeletlen fonálféreg	8993
Fonálféreg 1 mmol/L CuSO <sub>4</sub> -oldattal kezelve 24 óráig	8994
Fonálféreg 1 mmol/L Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -oldattal kezelve 24 óráig	8994
Fonálféreg 0,5 mol/L CuSO <sub>4</sub> -oldattal kezelve 1 óráig	8994

*5.5. táblázat: Referenciavegyületek és fonálféreg-minták réz K abszorpciós élének pozíciója (az első inflexiós pont alapján)*



5.31. ábra: Fonálféreg-minták XANES spektrumának összehasonlítása

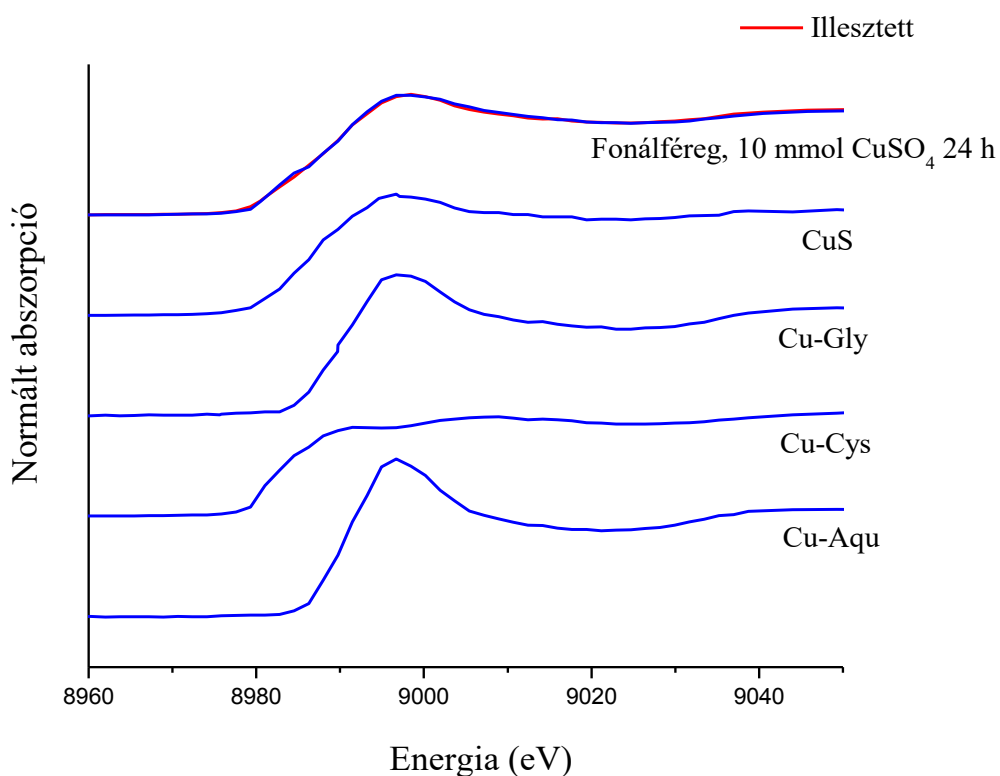


5.32. ábra: A CuI, Cu-Cys és a fonálféreg-minta XANES spektrumának első deriváltja (MySpot mérőhely)

A MySpot mérőhelynél a Cu-GSH XANES spektrumát nem tudtuk felvenni a csapadék nagyon gyors leülepedése miatt. A Cu-Cys előállításánál ebben az esetben nem alkalmaztam



savanyítást, az 5.32. ábra mutatja ezen vegyület, a CuI és a fonálféreg-minta XANES spektrumának első deriváltját. Megállapítható, hogy a Cu-Cys-ben ebben az esetben a réz +1-es oxidációs számmal van jelen. A minta spektrumának első deriváltjában a K abszorpciós él környékén két csúcsot találunk, ez az eredeti spektrumban lévő él előtti vállra utal, melyet szabad szemmel nem mindig venni észre. A  $\beta$  csúcs a fő abszorpciós átmenetet jelzi ( $1s \rightarrow 4p$ ), míg az  $\alpha$  csúcs az ennél kisebb energiájú  $1s \rightarrow 4p_z$  átmenetre utal. Utóbbi a síknégyszetes, illetve a tetragonálisan torzult oktaéderes szerkezetek esetén jellemző [279]. A minta XANES spektrumát illesztettem a referenciavegyületek spektrumának lineáris kombinációjával. Az illesztés eredményét és az illesztett spektrumban megtalálható referenciaspektrumokat az 5.33. ábra mutatja.

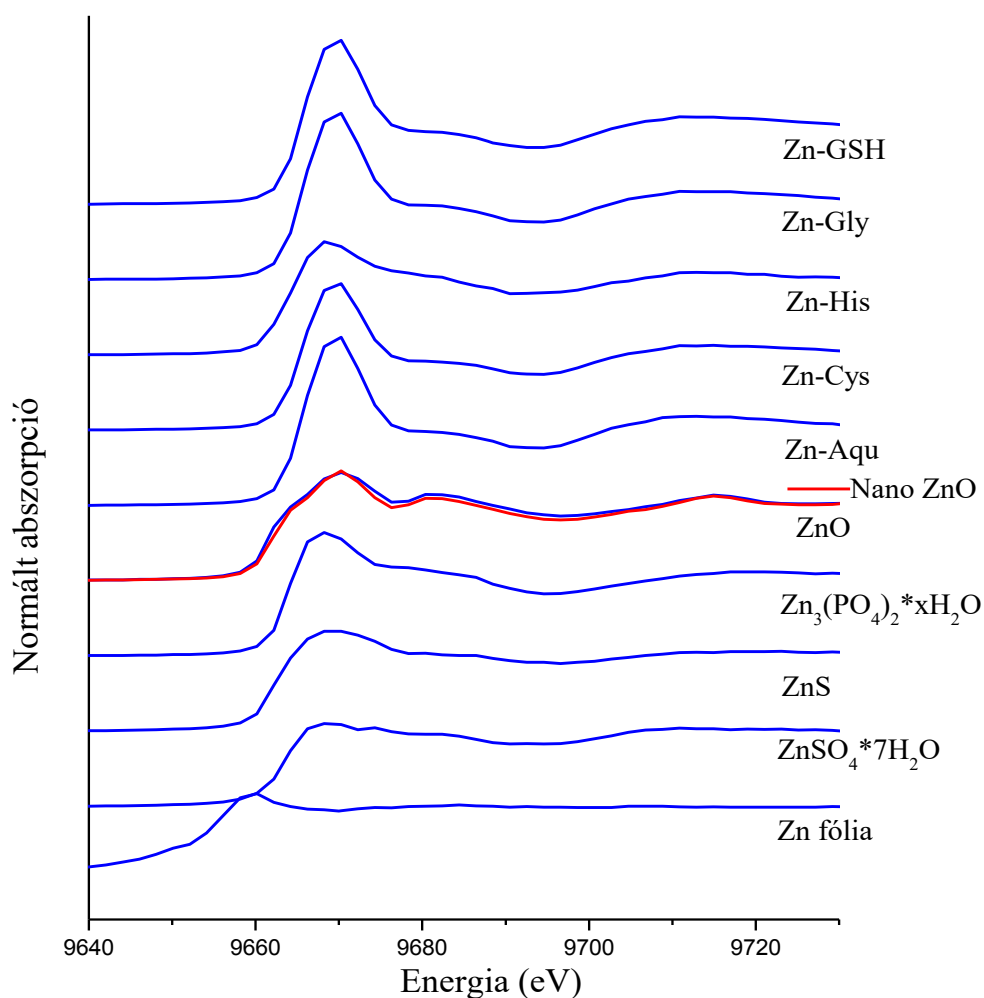


5.33. ábra: A kezelt állat XANES spektruma, az illesztés eredménye és az illesztett spektrum komponensei

Az illesztés eredménye a következő: Cu-Aqu: 20%; Cu-Cys: 27%; Cu-Gly: 12%; CuS: 41%; R-faktor: 0,000239. Ezek alapján a valószínűsíthető, hogy a kezeléssel bevitt réz jelentős része kéntartalmú specieszekhez kötődik.

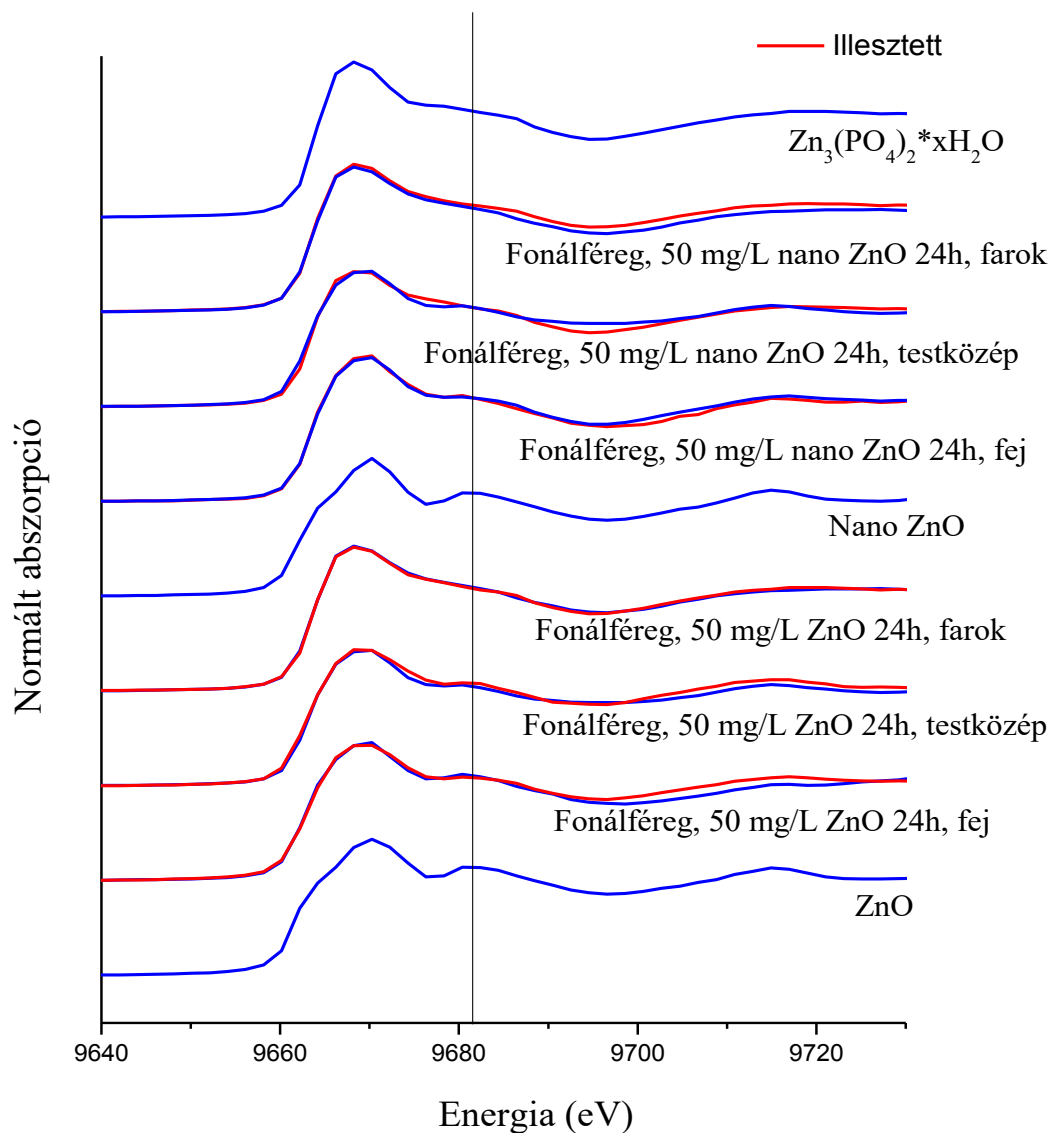
### 5.5.2. A cink kémiai környezetének vizsgálata

A referenciavegyületek XANES spektrumait az 5.34. ábrán tüntettem fel. Jól látszik, hogy a nagyszemcsés és nano ZnO spektruma nagyon hasonlít egymásra. A két formát spektrumuk alapján nem lehet megkülönböztetni.



5.34. ábra: Referenciavegyületek XANES spektruma

Az 5.35. ábra a nagyszemcsés és nano ZnO-szuszpenziókkal kezelt állatok spektrumát mutatja három különböző testtájon (fej, testközép, farok). Feltüntettem még az ábrán a nagyszemcsés és a nano ZnO, illetve a  $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  spektrumát, illetve a hat minta spektrumára lineáris kombinációval kapott illesztett spektrumokat. Az 5.6. táblázat az egyes illesztések eredményét tartalmazza.



5.35. ábra: Fonálféreg-minták és néhány referenciavegyület spektruma, a függőleges fekete vonal a ZnO él utáni csúcsának helyét jelöli (9682 eV)

Minta	ZnO/Nano ZnO	Zn <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> * xH <sub>2</sub> O	ZnS	Zn-Cys	ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	Zn-His	Zn-Aqu	Zn-Gly	R-faktor
<i>50 mg/L nagyszemcsés ZnO-szuszpenzió, 24 óra kezelési idő</i>									
Fej	32%	36%	32%	-	-	-	-	-	0,002569
Testközép	26%	54%	-	5%	-	15%	-	-	0,000301
Farok	-	81%	12%	-	-	-	2%	5%	0,000151
<i>50 mg/L nano ZnO-szuszpenzió, 24 óra kezelési idő</i>									
Fej	32%	62%	-	6%	-	-	-	-	0,000752
Testközép	-	82%	-	-	13%	5%	-	-	0,000147
Farok	-	66,5%	43,5%	-	-	-	-	-	0,000514

5.6. táblázat: A minták XANES spektrumának referenciavegyületek spektrumainak lineáris kombinációjával történő illesztésének eredménye

A minták spektrumán az abszorpciós él utáni csúcs meglétét illetve nem meglétét figyelembe véve megállapítható, hogy az állat fejében a cink megtalálható ZnO-ként mindkét kezelés esetén, míg a farok spektrumában – szintén mindkét kezelés esetén – a csúcs nincs jelen, ezek a spektrumok leginkább a  $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ -éra emlékeztetnek. Az illesztések eredménye is ezt támasztja alá. Ennek megfelelően mindegyik spektrumban a  $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$  dominál, bizonyos esetekben a ZnS jelenik még meg nagyobb mennyiségben. A nano ZnO-szuszpenzióval kezelt állat esetén csak a fej, míg a nagyszemcsés formával kezelt mintában a fej mellett a testközép spektrumában is megtalálható a nano ZnO, illetve a ZnO komponens, a farokban viszont egyik esetben sem, a ZnO átalakulásának mértéke nem azonos minden testtájon. Megállapítható továbbá, hogy a ZnO – függetlenül a részecskemérettől – főként foszfortartalmú ligandumokhoz kötődik. Ez összhangban van Zeitoun-Ghaondur és munkatársai megállapításaival, akik  $\text{ZnCl}_2$ -dal kezelt *C. elegans* XANES spektrumát vizsgálták, mely nagy hasonlóságot mutatott a  $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ -ével [262].

## 6. Összefoglalás

Napjaink egyre fokozódó ipari és mezőgazdasági tevékenységének köszönhetően a talajszennyezés egyre komolyabb problémát jelent. A talajlakó fonálférgeket gyakran használják bioindikátorként, az egyedszintű vizsgálat azonban ritka, pedig a fonálférgek kis méretüknek, ugyanakkor meglehetősen komplex életműködésüknek köszönhetően modellszervezetként is alkalmazhatók. Ezek alapján célul tűztem ki szervesen talajszennyező elemek fonálférgekre kifejtett hatásának vizsgálatára alkalmas mikroanalitikai módszerek kifejlesztését, valamint ezen módszerek felhasználást a réz, króm és ZnO-nanorészecskék felvételének, valamint az állatok testén belüli eloszlásának és speciációjának vizsgálatára.

Kifejlesztettem egy TXRF spektrometriai módszert, melynek segítségével egyedi minták mikro- és nyomelemtartalma vizsgálható. A módszer 9 elem mennyiségének meghatározására alkalmas természetes állapotú (mesterséges kezelésnek nem kitett) fonálférgekből. A módszer segítségével vizsgáltam a réz, króm és cink felvételét, mesterségesen készített oldatokból és szuszpenziókból. A réz és króm felvételének koncentrációfüggése telítési görbe jellegű,  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Cr}^{3+}$  ionok hatására az állat cinktartalma csökken,  $\text{CrO}_4^{2-}$  ezt nem tapasztaltam. Cink esetén az oldatból történő cinkfelvétel szignifikánsan kisebb, mint a szuszpenziókból, de a nagyszemcsés és nano forma közt nincs különbség.

Kifejlesztettem egy mintaelőkészítési módszert, melynek alkalmazása után egyedi fonálféreg-mintákban végezhető elemeloszlási vizsgálatok SEM, FIB és EPMA módszerek alkalmazásával, illetve a mesterséges kezeléssel bevitt elemek kémiai környezete vizsgálható XANES technikával.

Az EPMA módszer segítségével megállapítottam, hogy a kutikulában a réz eloszlása jól korrelál a kénével, a száj szerv rézfelvétele nem jelentős. FIB technika segítségével mesterséges keresztmetszeteket készítettem az állatokon és ezekben vizsgáltam az elemek eloszlását. Három kezelés esetén ( $\text{CuSO}_4$ - és  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ -oldat, valamint nano ZnO-szuszpénzió) is hasonló elemeloszlási képeket kaptam: kívülről befelé csökkenő elemtartalom. Ezek alapján mindhárom esetén valószínűsíthető a kutikuláris elemfelvétel meghatározó szerepe a szájon történő felvétellel szemben.

A réz és cink kémiai környezetét vizsgáltam XANES technikával. Előbbi esetén a mesterséges kezeléssel bevitt réz valószínűsíthetően nagyrészt kéntartalmú ligandumokhoz kötődik. A ZnO – függetlenül attól, hogy nagyszemcsés vagy nano formában alkalmaztam – az állat fejében még jelen van a farokban viszont már nem. A kezeléssel bevitt cink nagyrészt foszfortartalmú ligandumokhoz kötődik.

## 7. Summary

Due to the more and more increasing industrial and agricultural activity, soil pollution is of global concern. Soil-inhabiting nematodes are often applied as bioindicators, however, the investigation on individual level is rare, although nematodes can be used as model organisms due to their small size nevertheless quite complex life processes. Accordingly, the aim of my study was to develop microanalytical methods, which are able to investigate the effect of soil-polluting micro- and trace elements on nematodes. The application of the methods for studying the uptake as well as the distribution and speciation in the body of the nematode of the copper, chromium and ZnO nanoparticles is also proposed.

A TXRF method was developed, which is able to investigate the trace and microelement content of individual nematode samples. The method is able to determine the concentration of 9 elements in untreated nematodes. The uptake of copper, chromium and zinc from artificially prepared solutions and suspensions was studied by the technique. The concentration dependence of copper and chromium uptake shows a saturation curve-like feature. The  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cr}^{3+}$  ions reduce the zinc concentration of the worm, for  $\text{CrO}_4^{2-}$  it was not observed. In case of zinc, uptake from solution is significantly lower, than from suspension, however, between nano and bulk ZnO no difference was found.

A sample preparation method was developed, which enables elemental distribution measurements in individual samples by means of SEM, FIB and EPMA methods, as well as the investigation of the chemical environment of polluting elements with XANES technique.

Applying the EPMA technique, it was established that there is a high correlation between the distribution of sulfur and copper in the cuticle, the copper uptake of the stylet is not significant. By means of the FIB technique artificial cross-sections were prepared and elemental distributions were investigated there. In case of three treatments ( $\text{CuSO}_4$  and  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  solutions as well as nano ZnO suspension), the elemental distributions show similar trend: decreasing treating element content toward the center of the cross-section. Accordingly, for all the three elements, not the gut but the cuticular uptake plays the dominant role.

The chemical environment of copper and zinc was investigated by XANES technique. The copper applied as artificial treating agent was found to be bind mainly to sulfur-containing ligands. The ZnO – independently of its bulk or nano type – takes place in the head, however in the tail it is transformed to another compound. The zinc taken up from the treating solution binds mainly to phosphorus-containing ligands.

## Rövidítések jegyzéke

AAS: Atomabszorpciós spektrometria

*C. Elegans*: *Caenorhabditis elegans*

Cu-Aqu: Réz-akvakomplex (5 mmol/L CuSO<sub>4</sub>-oldat)

Cu-Cys: Réz-cisztein komplex

Cu-Glu: Réz-glutaminsav komplex

Cu-Gly: Réz-glicin komplex

Cu-GSH: Réz-glutation komplex

Cu-His: Réz-hisztidin komplex

CVAAS: Hideggőzős atomabszorpciós spektrometria

EELS: Elektron energiaveszteségi spektrometria

EPMA: Elektronsugaras mikroanalízis

EXAFS: Extended X-ray Absorption Fine Structure (magyar fordítását nem használjuk)

FAAS: Lángatomabszorpciós spektrometria

FIB: Fókuszált ionnyaláb

GFAAS: Grafitkemencés atomabszorpciós spektrometria

Gly: Glicin

HPGe: Nagytisztaságú germánium detektor

ICP-MS: Induktív csatolású plazma tömegspektrometria

ICP-OES: Induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria

INAA: Műszeres neutronaktivációs analízis

NMR: Mágneses magrezonancia

ROS: Reaktív oxigén speciesz

SDD: szilícium drift detektor

SEM: Pásztázó elektronmikroszkópia/elektronmikroszkópia

SR-TXRF: Szinkrotronnal segített totálreflexiós röntgenfluoreszcens spektrometria

STEM: Pásztázó transzmissziós elektronmikroszkóp/elektronmikroszkópia

SXRF: Szinkrotronnal segített röntgenfluoreszcens spektrometria

TEM: Transzmissziós elektronmikroszkóp/elektronmikroszkópia

TXRF: Totálreflexiós röntgenfluoreszcencia

XANES: X-ray absorption near edge structure (magyar fordítását nem használjuk)

XAS: Röntgenabszorpciós spektrometria

XRD: Röntgendiffrakció



XRF: Röntgenfluoreszcens spektrometria  
Zn-Aqu: Cink-akvakomplex (5 mmol/L ZnSO<sub>4</sub>-oldat)  
Zn-Cys: Cink-cisztein komplex  
Zn-Gly: Cink-glicin komplex  
Zn-GSH: Cink-glutation komplex  
Zn-His: Cink-hisztidin komplex

## Irodalomjegyzék

1. S. Szakács, Talajtan, Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Kolozsvár, 2008.
2. Z. Szalai, G. Jakab, Bevezetés a talajtanba környezettanósoknak, Typotex, Budapest, 2011.
3. E. Wcislo, Soil contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Poland - a review, Pol. J. of Environ. Stud. 7 (1998) 267-272.
4. M. S. Abdel-Rahman, R. M. Turkall, Determination of oral or dermal benzene exposure from contaminated soils, Int. J. Soil Sediment Water 3 (2010) Issue 3, Article 4, 1-12.
5. S. Fiore, C. Zanetti, Sorption of phenols: influence of groundwater pH and soil organic carbon content, Am. J. Environ. Sci. 5 (2009) 547-555.
6. S. Kauppi, Bioremediation of diesel oil contaminated soil and water, akadémiai disszertáció, Helsinki Egyetem, Lahti, 2011.
7. V. Andreu, Y. Pico, Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 772-789.
8. Y. Guibiao, Z. Wei, C. Xin, P. Canping, J. Shuren, Determination and quantitation of ten sulfonylurea herbicides in soil samples using liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection, Chinese J. Anal. Chem. 34 (2006) 1207-1212.
9. M. R. Latha, R. Indirani, S. Kamaraj, Bioremediation of polluted soils - a review, Agr. Rev. 25 (2004) 252-266.
10. P. Csathó, A környezet nehézfém szennyezettsége és az agrártermelés, MTA Talajtani és Agrokémiai Kutatóintézete, Budapest, 1994.
11. F. Ekmekyapar, T. Sabudak, G. Seren, Assessment of heavy metal contamination in soil and wheat (*Triticum Aestivum L.*) plant around the Corlu-Cerkezkoy highway in Thrace region, Global NEST J. 14 (2012) 496-504.
12. F. Zhang, X. Yan, C. Zeng, M. Zhang, S. Shrestha, L. P. Devkota, T. Yao, Influence of traffic activity on heavy metal concentrations of roadside farmland soil in mountainous areas, Int. J. Environ. Res. Public Health 9 (2012) 1715-1731.

13. T. A. Yekeen, T. O. Onifade, Evaluation of some heavy metals in soils along a major road in Ogbomoso, South West Nigeria, *J. Environ. Earth Sci.* 2 (2012) 71-79.
14. A. Plesnicar, N. Zupancic, Heavy metal contamination of roadside soil along Ljubljana-Obrezje highway, *Mat. Geoenviron.* 52 (2005) 403-418.
15. J. C. Fernandez-Caliani, C. Barba-Brioso, I. Gonzalez, E. Galan, Heavy metal pollution in soils around the abandoned mine sites of the Iberian Pyrite Belt (Southwest Spain), *Water Air Soil Poll.* 200 (2009) 211-226.
16. M. J. Gutierrez-Gines, J. Pastor, A. J. Hernandez, Effect of heavy metals from mine soils on *Avena Sativa* L. and education strategies, *Fresen. Environ. Bull.* 19 (2010) 2083-2086.
17. S. Girigisu, I. G. E. Ibeanu, D. J. Adeyemo, S. Okoh, Determination of heavy metals and other elements in artisanal gold mining soils, *Am. J. Appl. Sci.* 9 (2012) 1014-1019.
18. V. Sheoran, P. Poonia, S. K. Trivedi, Metal pollution in soil and plants near copper mining site, *Int. J. Geol. Earth Environ. Sci.* 1 (2011) 27-34.
19. K. Greiciute, A. Juozulynas, G. Surkiene, V. Valeikiene, Research on soil disturbance and pollution with heavy metals in military grounds, *Geologija* 57 (2007) 14-20.
20. B. H. Robinson, S. Bischofberger, A. Stoll, D. Schroer, G. Furrer, S. Roulier, A. Gruenwald, W. Attinger, R. Schulin, Plant uptake of trace elements on a Swiss military shooting range: Uptake pathways and land management implications, *Environ. Pollut.* 153 (2008) 668-676.
21. P. E. Aikpokpodion, L. Lajide, A. F. Aiyesanmi, Heavy metals contamination in fungicide treated cocoa plantations in Cross River State, Nigeria, *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 8 (2010) 268-274.
22. C. Njoku, P. N. Ngene, A. C. Nwogbaga, Assessment of selected heavy metals in sewage sludge disposal soils in Abakaliki, Southeastern Nigeria, *Greener J. Phys. Sci.* 2 (2012) 117-119.
23. Y. A. Iyaka, S. E. Kakulu, Heavy metal concentrations in top agricultural soils around ceramic and pharmaceutical industrial sites in Niger State, Nigeria, *Res. J. Environ. Earth Sci.* 4 (2012) 171-176.
24. D. Shivakumar, S. Srikantaswamy, Heavy metals pollution assessment in industrial area soil of Mysore city, Karnataka, India, *Int. J. Appl. Sci. Eng. Res.* 1 (2012) 604-611.
25. A. Ene, A. Bosneaga, L. Georgescu, Determination of heavy metals in soils using XRF technique, *Rom. J. Phys.* 55 (2010) 815-820.

26. R. N. Malik, S. Z. Husain, I. Nazir, Heavy metal contamination and accumulation in soil and wild plant species from industrial area of Islamabad, Pakistan, *Pak. J. Bot.* 42 (2010) 291-301.
27. M. I. Szyrkowska, A. Pawlaczyk, E. Lesniewska, T. Paryjczak, Toxic metal distribution in rural and urban soil samples affected by industry and traffic, *Pol. J. Environ. Stud.* 6 (2009) 1141-1150.
28. R. A. Wuana, F. O. Okieimen, Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation, *ISRN Ecol.*, Volume 2011, ID 402647.
29. A. Deluisa, P. Giandon, M. Aichner, P. Bortolami, L. Bruna, A. Lupetti, F. Nardelli, G. Stringari, Copper pollution in italian vineyard soils, *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 27 (1996) 1537-1548.
30. C. Parat, R. Chaussod, J. Leveque, S. Dousset, F. Andreux, The relationship between copper accumulated in vineyard calcareous soils and soil organic matter and iron, *Eur. J. Soil Sci.* 53 (2002) 663-670.
31. E. Vavoulidou, E. J. Avramides, P. Papadopoulos, A. Dimirkou, A. Charoulis, S. Konstantinidou-Doltsinis, Copper content in agricultural soils related to cropping systems in different regions of Greece, *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 36 (2005) 759-773.
32. M. Komarek, J. Szakova, M. Rohoskova, H. Javorska, V. Chrastny, J. Balik, Copper contamination of vineyard soils from small wine producers: A case study from the Czech Republic, *Geoderma* 147 (2008) 16-22.
33. M. Toselli, P. Schiatti, D. Ara, A. Bertacchini, M. Quartieri, The accumulation of copper in soils of the Italian region Emilia-Romagna, *Plant Soil Environ.* 55 (2009) 74-79.
34. N. Mirlean, A. Roisenberg, J. O. Chies, Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil), *Environ. Pollut.* 149 (2007) 10-17.
35. C. E. Martinez, H. L. Motto, Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils, *Environ. Pollut.* 107 (2000) 153-158.
36. S. Ferguson-Miller, G. T. Babcock, Heme/copper terminal oxidases, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2889-2907.
37. I. A. Abreu, D. E. Cabelli, Superoxide dismutases – a review of the metal-associated mechanistic variations, *Biochim. Biophys. Acta* 1804 (2010) 263-274.
38. P. Coyle, J. C. Philcox, L. C. Carey, A. M. Roife, Metallothionein: The multipurpose protein, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 627-647.

39. H. Tapiero, D. M. Townsend, K. D. Tew, Trace elements in human physiology and pathology. Copper, Biomed. Pharmacother. 57 (2003) 386-398.
40. P. C. Bull, D. W. Cox, Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport, Trends Genet. 10 (1994) 246-252.
41. B. R. Stern, M. Solioz, D. Krewski, P. Aggett, T. Aw, S. Baker, K. Crump, M. Dourson, L. Haber, R. Hertzberg, C. Keen, B. Meek, L. Rudenko, R. Schoeny, W. Slob, T. Starr, Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships, J. Toxicol. Environ. Health B 10 (2007) 157-222.
42. B. J. Alloway, Heavy Metals in Soils, Blackie Academic & Professional, London, 1995.
43. M. C. Chukwuma, E. T. Eshett, E. U. Onweremadu, M. A. Okon, Zinc availability in relation to selected soil properties in a crude oil polluted eutric tropofluvent, Int. J. Sci. Technol. 7 (2010) 261-270.
44. I. Muhammad, M. Puschenreiter, W. W. Wenzel, Cadmium and Zn availability as affected by pH manipulation and its assessment by soil extraction, DGT and indicator plants, Sci. Total Environ. 416 (2012) 490-500.
45. G. S. Sidhu, B. D. Sharma, Diethylenetriaminepentaacetic acid-extractable micronutrients status in soil under a rice-wheat system and their relationship with soil properties in different agroclimatic zones of Indo-Gangetic plains of India, Comm. Soil Sci. Plant Anal. 41 (2010) 29-51.
46. R. L. Yadav, M. C. Meena, Available micronutrients status and their relationship with soil properties of Degana soil series of Rajasthan, J. Ind. Soc. Soil Sci. 57 (2009) 90-92.
47. B. Klimek, Effect of long-term zinc pollution on soil microbial community resistance to repeated contamination, B. Environ. Contam. Tox. 88 (2012) 617-622.
48. W. Ahmad, M. J. Watts, M. Imtiaz, I. Ahmed, M. H. Zia, Zinc deficiency in soils, crops and humans, Agrochimica 56 (2012) 65-97.
49. M. Varga, Bioszervetlen Kémia, ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, 2006.
50. S. Lindskog, Structure and mechanism of carbonic anhydrase, Pharmac. Therapeut. 74 (1997) 1-20.
51. D. W. Christianson, Carboxypeptidase A, Accounts Chem. Res. 22 (1989) 62-69.
52. E. E. Kim, H. W. Wyckoff, Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structure, J. Mol. Biol. 218 (1991) 449-464.
53. H. Jörnvall, Alcohol dehydrogenases, aldehyde dehydrogenases, and related enzymes, Alcohol 2 (1985) 61-66.

54. J. H. Laity, B. M. Lee, P. E. Wright, Zinc finger proteins: new insight into structural and functional diversity, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 11 (2001) 39-46.
55. H. Yanagisawa, Zinc deficiency and Clinical Practice, *Jap. Med. Assoc. J.* 47 (2004) 359-364.
56. G. J. Fosmire, Zinc toxicity, *Am. J. Clin. Nutr.* 51 (1990) 225-227.
57. C. Veillon, K. Y. Patterson, Analytical issues in nutritional chromium research, *J. Trace Elem. Exp. Med.* 12 (1999) 99-109.
58. A. Yamamoto, O. Wada, T. Ono, Isolation of a biologically active low-molecular-mass chromium compound from rabbit liver, *Eur. J. Biochem.* 165 (1987) 627-631.
59. J. B. Vincent, The biochemistry of chromium, *J. Nutr.* 130 (2000) 715-718.
60. A. D. Dayan, A. J. Paine, Mechanism of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: Review of the literature from 1985 to 2000, *Hum. Exp. Toxicol.* 20 (2001) 439-451.
61. J. K. Speetjens, R. A. Collins, J. B. Vincent, S. A. Woski, The nutritional supplement chromium(III) tris(picollinate) cleaves DNA, *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1999) 483-487.
62. D. Basketter, L. Horev, D. Slodovnik, S. Merimes, A. Trattner, A. Ingber, Investigation of the threshold for allergic reactivity to chromium, *Contact Dermatitis* 44 (2001) 70-74.
63. D. Newman, A case of adeno-carcinoma of the left inferior turbinated body, and perforation of the nasal septum, in the person of a worker in chrome pigments, *Glasgow Med. J.* 33 (1890) 469-470.
64. M. D. Cohen, B. Kargacin, C. B. Klein, M. Costa, Mechanism of chromium carcinogenicity and toxicity, *Crit. Rev. Toxicol.* 23 (1993) 255-281.
65. M. Vert, Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, F. Schue, Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012), *Pure Appl. Chem.* 84 (2012) 377-410.
66. P. L. Kool, M. D. Ortiz, C. A. M. van Gestel, Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl<sub>2</sub> to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 2713-2719.
67. E. Navarro, A. Baun, R. Behra, N. B. Hartmann, J. Filser, A.-J. Miao, A. Quigg, P. H. Santschi, L. Sigg, Environmental Behaviour and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants and fungi, *Ecotoxicology* 17 (2008) 372-386.
68. R. C. Monica, R. Cremonini, Nanoparticles and higher plants, *Caryologia* 62 (2009) 161-165.

69. A. C. Harms, R. E. Leuchtner, S. W. Sigsworth, A. W. Castleman Jr., Gas-phase reactivity of metal alloy clusters, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 5673-5674.
70. J.-P. Borel, Thermodynamical size effect and the structure of metallic clusters, *Surf. Sci.* 106 (1981) 1-9.
71. D. M. Mittleman, R. W. Schoenlein, J. J. Shiang, V. L. Colvin, A. P. Alivisatos, C. V. Shank, Quantum size dependence of femtosecond electronic dephasing and vibrational dynamics in CdSe nanocrystals, *Phys. Rev. B* 49 (1994) 14435-14447.
72. D. Lin, B. Xing, Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth, *Environ. Pollut.* 150 (2007) 243-250.
73. B. Nowack, T. D. Bucheli, Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment, *Environ. Pollut.* 150 (2007) 5-22.
74. J. Prousek, Fenton chemistry in biology and chemistry, *Pure Appl. Chem.* 79 (2007) 2325-2338.
75. A. Nel, T. Xia, L. Mädler, N. Li, Toxic potential of materials at the nanolevel, *Science* 311 (2006) 622.
76. L. J. Marnett, Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage, *Toxicology* 181-182 (2002) 219-222.
77. G. Buonocore, S. Perrone, M. L. Tataranno, Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species, *Semin. Fetal Neonat. M.* 15 (2010) 186-190.
78. A. M. Derfus, W. C. W. Chan, S. N. Bhatia, Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots, *Nano Lett.* 4 (2004) 11-78.
79. T. J. Brunner, P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R. N. Grass, L. K. Limbach, A. Bruinink, W. J. Stark, In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 4374-4381.
80. F. Gottschalk, T. Sonderer, R. W. Scholz, B. Nowack, Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 9216-9222.
81. N. C. Mueller, B. Nowack, Nanoparticles for remediation: solving big problems with little particles, *Elements* 6 (2010) 395-400.
82. S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin, J. R. Lead, Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 1825-1851.

83. L. V. Antisari, S. Carbone, A. Gatti, G. Vianello, P. Nannipieri, Toxicity of metal oxide (CeO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, SnO<sub>2</sub>) engineered nanoparticles on soil microbial biomass and their distribution in soil, *Soil Biol. Biochem.* 60 (2013) 87-94.
84. T. Ben-Moshe, S. Frenk, I. Dror, D. Minz, B. Berkowitz, Effects of metal oxide nanoparticles on soil properties, *Chemosphere* 90 (2013) 640-646.
85. O. Sagee, I. Dror, B. Berkowitz, Transport of silver nanoparticles (AgNPs) in soil, *Chemosphere* 88 (2012) 670-675.
86. P. L. Kool, M. D. Ortiz, C. A. M. van Gestel, Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl<sub>2</sub> to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 2713-2719.
87. W.-M. Lee, J. I. Kwak, Y.-J. An, Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity, *Chemosphere* 86 (2012) 491-499.
88. H. Wang, R. L. Wick, B. Xing, Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub> to the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 1171-1177.
89. H. L. Hooper, K. Jurkschat, A. J. Morgan, J. Bailey, A. J. Lawlor, D. J. Spurgeon, C. Svendsen, Comparative chronic toxicity of nanoparticulate and ionic zinc to the earthworm *Eisenia veneta* in a soil matrix, *Environ. Int.* 37 (2011) 1111-1117.
90. S. B. Lovern, J. R. Strickler, R. Klaper, Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (Titanium Dioxide, Nano-C<sub>60</sub>, and C<sub>60</sub>HxC<sub>70</sub>Hx), *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 4465-4470.
91. R. J. Griffitt, R. Weil, K. A. Hyndman, N. D. Denslow, K. Powers, D. Taylor, D. S. Barber, Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*), *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 8178-8186.
92. T. G. Smijs, S. Pavel, Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness, *Nanotechnology, Science and Applications* 4 (2011) 95-112.
93. A. Kahru, H.-C. Dubourguier, From ecotoxicology to nanoecotoxicology, *Toxicology* 269 (2010) 105-119.
94. N. M. Franklin, N. J. Rogers, S. C. Apte, G. E. Batley, G. E. Gadd, P. S. Casey, Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 8484-8490.
95. M. Mortimer, K. Kasemets, A. Kahru, Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*, *Toxicology* 269 (2010) 182-189.

96. L. Zhao, J. R. Peralta-Videa, M. Ren, A. Varela-Ramirez, C. Li, J. A. Hernandez-Viezcas, R. J. Aguilera, J. L. Gardea-Torresdey, Transport of Zn in a sandy loam soil treated with ZnO NPs and uptake by corn plants: Electron microprobe and confocal microscopy studies, *Chem. Eng. J.* 184 (2012) 1-8.
97. D. Lin, B. Xing, Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 5580-5585.
98. T. Bongers, H. Ferris, Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring, *Trends Ecol. Evol.* 14 (1999) 224-228.
99. J.-P. Hugot, P. Baujard, S. Morand, Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview, *Nematology* 3 (2001) 199-208.
100. T. Blumenthal, R. E. Davis, Exploring nematode diversity, *Nat. Genet.* 36 (2004) 1246-1247.
101. N. M. Gubanov, Giant nematoda from the placenta of Cetacea; *Placentonema gigantissima* nov. gen., nov. sp., *Proc. Acad. Sci. USSR* 77 (1951) 1123-1125.
102. R. D. Barnes, *Invertebrate zoology*, Saunders College, Philadelphia, 1980.
103. A. P. Page, I. L. Johnstone, The cuticle, in: J. M. Kramer, D. G. Moerman (Eds.), *WormBook*, C. elegans Research Community, Pasadena, 2007, pp. 1-15.
104. I. L. Johnstone, Cuticle collagen genes expression in *Caenorhabditis elegans*, *Trends Genet.* 16 (2000) 21-27.
105. M. Sebastiano, F. Lassandro, P. Bazzicalupo, *cut-1* a *Caenorhabditis elegans* gene coding for a dauer-specific noncollagenous component of the cuticle, *Dev. Biol.* 146 (1991) 519-530.
106. Y. Spiegel, M. A. McClure, The surface coat of plant-parasitic nematodes: chemical composition, origin, and biological role – A review, *J. Nematol.* 27 (1995) 127-134.
107. R. L. Koptal, *Modern Text Book of Zoology: Invertebrates*, Rastogi Publications, Gangotri, 2009-2010.
108. R. V. Anderson, J. A. Trofymow, D. C. Coleman, C. P. P. Reid, Phosphorus mineralization by a soil pseudomonad in spent oil shale as affected by a rhabditid nematode, *Soil Biol. Biochem.* 14 (1982) 365-371.
109. M. C. Savin, J. H. Görres, D. A. Neher, J. A. Amador, Uncoupling of carbon and nitrogen mineralization: role of microbivorous nematodes, *Soil Biol. Biochem.* 33 (2001) 1463-1472.
110. J. Chen, H. Ferris, The effect of nematode grazing on nitrogen mineralization during fungal decomposition of organic matter, *Soil Biol. Biochem.* 31 (1999) 1265-1279.



111. D. Buchan, M. T. Gebremikael, N. Ameloot, S. Sleutel, S. de Neve, The effect of free-living nematodes on nitrogen mineralisation in undisturbed and disturbed soil cores, *Soil Biol. Biochem.* 60 (2013) 142-155.
112. G. W. Yeates, T. Bongers, R. G. M. de Goede, D. W. Freckman, S. S. Georgieva, Feeding habitats in soil nematode families and genera – an outline for soil ecologists, *J. Nematol.* 25 (1993) 315-331.
113. J. L. Starr, R. Cook, J. Bridge, *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*, CABI Publishing, Wallingford, 2002.
114. R. N. Perry, M. Moens, *Plant Nematology*, CABI Publishing, Wallingford, 2006.
115. M. Luc, M. B. Lima, B. Weischer, J. J. M. Flegg, *Xiphinema vuittenezi* n. sp. (Nematoda: Dorylaimidae), *Nematologica* 10 (1964) 151-163.
116. L. Barsi, F. Lamberti, Morphometric variation and juvenile stages of *Xiphinema vuittenezi* (Nematoda: Dorylaimida) in Serbia, *Nematol. Medit.* 28 (2000) 3-12.
117. I. Andrassy, K. Farkas, *Kertészeti növények fonálféreg kártevői – Agronematológiai kézikönyv*, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1988.
118. E. Cseh, Á. Daragó, A. Takács, R. Gáborjányi, Szőlővírusok gyakoriságának felmérése magyarországi szőlőültetvényekben, *Kertgazdaság* 43 (2011) 63-67.
119. B. Markert, O. Wappelhorst, V. Weckert, U. Herpin, U. Siewers, K. Friese, G. Breulmann, The use of bioindicators for monitoring the heavy-metal status of the environment, *J. Radioanal. Nucl. Ch.* 240 (1999) 425-429.
120. D. L. Porazinska, L. W. Duncan, R. McSorley, J. H. Graham, Nematode communities as indicators of status and processes of a soil ecosystem influenced by agricultural management practices, *Appl. Soil Ecol.* 13 (1999) 69-86.
121. G. Bakonyi, P. Nagy, Temperature- and moisture-induced changes in the structure of the nematode fauna of a semiarid grassland – patterns and mechanisms, *Glob. Change Biol.* 6 (2000) 697-707.
122. Y. Shao, W. Zhang, J. Shen, L. Zhou, H. Xia, W. Shu, H. Ferris, S. Fu, Nematodes as indicators of soil recovery in tailings of a lead/zinc mine, *Soil Biol. Biochem.* 40 (2008) 2040-2046.
123. B.-Y. Park, J.-K. Lee, H.-M. Ro, Y. H. Kim, Effects of heavy metal contamination from an abandoned mine on nematode community structure as an indicator of soil ecosystem health, *Appl. Soil Ecol.* 51 (2011) 17-24.

124. P. Nagy, G. Bakonyi, T. Bongers, I. Kádár, M. Fábián, I. Kiss, Effects of microelements on soil nematode assemblages seven years after contaminating on agricultural field, *Sci. Total Environ.* 320 (2004) 131-143.
125. R. A. Ankeny, S. Leonelli, What's so special about model organisms?, *Stud. Hist. Philos. Sci.* 42 (2011) 313-323.
126. B. Müller, U. Grossniklaus, Model organisms – A historical perspective, *J. Proteomics* 73 (2010) 2054-2063.
127. H. Horvitz, Worms, life, and the death (Nobel lecture), *ChemBioChem* 4 (2003) 697-711.
128. M. Tatar, A. Bartke, A. Antebi, The endocrine regulation of aging by insulin-like signals, *Science* 299 (2003) 1346-1351.
129. W. C. Röntgen, On a new kind of rays, *Nature* 53 (1896) 274-276.
130. C. G. Barkla, IX. Bakerian Lecture – On X-rays and the theory of radiation, *Phil. Trans. A* 217 (1918) 315-360.
131. J. Osán, S. Kurunczi, S. Török, I. Varga, Röntgenfluoreszcens spektrometria, in: G. Záray (Ed.), *Az elemanalitika korszerű módszerei*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 2006, pp. 353-416.
132. R. Klockenkamper, *Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997.
133. H. G. J. Moseley, The high-frequency spectra of the elements, *Philos. Mag.* 26 (1913) 1024-1034., 27 (1914) 703-713.
134. R. van Grieken, M. de Bruin, Nomenclature for radioanalytical chemistry, *Pure Appl. Chem.* 66 (1994) 2513-2526.
135. T. J. Kneip, G. R. Laurer, Isotope excited X-ray fluorescence, *Anal. Chem.* 44 (1972) 57-68.
136. W. L. Bragg, The diffraction of short electromagnetic waves by a crystal, *P. Camb. Philos. Soc.* 17 (1913) 43-57.
137. A. H. Compton, The total reflection of X-rays, *Philos. Mag.* 45 (1923) 1121-1131.
138. Y. Yoneda, T. Horiuchi, Optical flats for use in X-ray spectrochemical microanalysis, *Rev. Sci. Instrum.* 42 (1971) 169-170.
139. H. Aiginger, P. Wobrauschek, A method for quantitative X-ray fluorescence analysis in the nanogram region, *Nucl. Instrum. Methods* 114 (1974) 157-158.
140. K. Baur, S. Brennan, D. Werho, L. Moro, P. Pianetta, Recent advances and perspectives in synchrotron radiation TXRF, *Nucl. Instrum. Meth. B* 467-468 (2001) 1198-1201.

141. E. Matsumoto, S. M. Simabuco, C. A. Perez, V. F. N. Filho, Atmospheric particulate analysis by synchrotron radiation total reflection (SR-TXRF), *X-Ray Spectrom.* 31 (2002) 136-140.
142. H. Schwenke, J. Knoth, A highly sensitive energy-dispersive X-ray spectrometer with multiple total reflection of the exciting beam, *Nucl. Instrum. Methods* 193 (1982) 239-243.
143. A. von Bohlen, Total reflection X-ray fluorescence and grazing incidence X-ray spectrometry – Tools for micro- and surface analysis. A review, *Spectrochim. Acta B* 64 (2009) 821-832.
144. R. Klockenkamper, A. von Bohlen, Determination of the critical thickness and the sensitivity for thin-film analysis by total reflection X-ray fluorescence spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 44 (1989) 461-469.
145. D. K. G. de Boer, X-ray standing waves and the critical sample thickness for total-reflection X-ray fluorescence analysis, *Spectrochim. Acta B* 46 (1991) 1433-1436.
146. C. Streli, P. Kregsamer, P. Wobrauschek, H. Gatterbauer, P. Pianetta, S. Pahlke, L. Fabry, L. Palmetshofer, M. Schmeling, Low Z total reflection X-ray fluorescence analysis – challenges and answers, *Spectrochim. Acta B* 54 (1999) 1433-1441.
147. H. Hoefler, C. Streli, P. Wobrauschek, M. Óvári, G. Záray, Analysis of low Z elements in various environmental samples with total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 61 (2006) 1135-1140.
148. Z. Polgári, N. Szoboszlai, M. Óvári, G. Záray, Possibilities and limitations of the total reflection X-ray fluorescence spectrometry for the determination of low Z elements in biological samples, *Microchem. J.* 99 (2011) 339-343.
149. J. Injuk, R. van Grieken, R. Klockenkamper, A. von Bohlen, P. Kump, Performance and characteristics of two total-reflection X-ray fluorescence and a particle induced X-ray emission setup for aerosol analysis, *Spectrochim. Acta B* 52 (1997) 977-984.
150. K. Huhnerfuss, A. von Bohlen, D. Kurth, Characterization of pigments and colors used in ancient Egyptian boat models, *Spectrochim. Acta B* 61 (2006) 1224-1228.
151. A. von Bohlen, R. Klockenkamper, G. Tolg, B. Wiecken, Microtome sections of biomaterials for trace analyses by TXRF, *Fresen. Z. Anal. Chem.* 331 (1988) 454-458.
152. M. Mages, S. Woelfl, M. Óvári, W. von Tumpling, F. Encina, The use of a portable total reflection X-ray fluorescence spectrometer for trace element determination in freshwater microcrustaceans (*Daphnia*), *Spectrochim. Acta B* 59 (2004) 1265-1272.

153. E. Margui, I. Queralt, M. Hidalgo, Determination of cadmium at ultratrace levels in environmental water samples by means of total reflection X-ray spectrometry after dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 28 (2013) 266-273.
154. U. Reus, Determination of trace elements in oils and greases with total reflection X-ray fluorescence: sample preparation methods, *Spectrochim. Acta B* 46 (1991) 1403-1411.
155. U. Reus, Total reflection X-ray fluorescence spectrometry: matrix removal procedures for trace analysis of high-purity silicon, quartz and sulphuric acid, *Spectrochim. Acta B* 44 (1989) 533-541.
156. S. Dhara, N. L. Misra, S. D. Maind, S. A. Kumar, N. Chattopadhyay, S. K. Aggarwal, Forensic application of total reflection X-ray fluorescence spectrometry for elemental characterization of ink samples, *Spectrochim. Acta B* 65 (2010) 167-170.
157. U. Weisbrod, R. Gutschke, J. Knoth, H. Schwenke, X-ray induced fluorescence spectrometry at grazing incidence for quantitative surface and layer analysis, *Fresen. Z. Anal. Chem.* 341 (1991) 83-86.
158. H. Schwenke, J. Knoth, R. Günther, G. Wiener, R. Bormann, Depth profiling using total reflection X-ray fluorescence spectrometry alone and in combination with ion beam sputtering, *Spectrochim. Acta B* 52 (1997) 795-803.
159. R. Klockenkamper, H. W. Becker, H. Bubert, H. Jenett, A. von Bohlen, Depth profiles of a shallow implanted layer in a Si wafer determined by different methods of thin-layer analysis, *Spectrochim. Acta B* 57 (2002) 1593-1599.
160. N. Szoboszlai, Z. Polgári, V. G. Mihucz, G. Záray, Recent trends in total reflection X-ray fluorescence spectrometry for biological applications, *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 1-18.
161. D. Barthelme, U. Scheele, S. Dinkelaker, A. Janoschka, F. MacMillan, S.-V. Albers, A. J. M. Driessen, M. S. Stagni, E. Bill, W. Meyer-Klaucke, V. Schünemann, R. Tampe, Structural organization of essential iron-sulfur clusters in the evolutionarily highly conserved ATP-binding cassette protein ABCE1, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 14598-14607.
162. M. Mertens, C. Rittmeyer, B. O. Kolbesen, Evaluation of the protein concentration in enzymes via determination of sulfur by total reflection X-ray fluorescence spectrometry – limitations of the method, *Spectrochim. Acta B* 56 (2001) 2157-2164.
163. S. Schilling, C. Lindner, B. Koch, M. Wermann, J.-U. Rahfeld, A. von Bohlen, T. Rudolph, G. Reuter, H.-U. Demuth, Isolation and characterization of glutamyl cyclases from *Drosophila*: evidence for enzyme forms with different subcellular localization, *Biochemistry* 46 (2007) 10921-10930.

164. Y. Zhen, C. W. Hoganson, G. T. Babcock, S. Ferguson-Miller, Definition of the interaction domain for cytochrome c on cytochrome c oxidase J. Biol. Chem. 274 (1999) 38032-38041.
165. R. F. Ruiz, J. D. Tornero, V. M. Gonzalez, C. Alonso, Quantification of Pt bound to DNA using total-reflection X-ray fluorescence (TXRF), Analyst 124 (1999) 583-585.
166. J. Messerschmidt, A. von Bohlen, F. Alt, R. Klockenkamper, Separation and enrichment of palladium and gold in biological and environmental samples, adapted to the determination by total reflection X-ray fluorescence, Analyst 125 (2000) 397-399.
167. E. D. Greaves, L. M. M. Parra, A. Rojas, L. Sajo-Bohus, Determination of platinum levels in serum and urine samples from pediatric cancer patients by TXRF, X-ray Spectrom. 29 (2000) 349-353.
168. A. Prange, H. Bodekker, W. Michaelis, Multi-element determination of trace elements in whole blood and blood serum by TXRF, Fresen. Z. Anal. Chem. 335 (1989) 914-918.
169. C. T. Yap, X-ray total reflection fluorescence analysis of iron, copper, zinc, and bromine in human serum, Appl. Spectrosc. 42 (1988) 1250-1253.
170. C. Zarkadas, A. G. Karydas, T. Paradellis, Applicability of direct total reflection X-ray fluorescence analysis in the case of human blood serum samples, Spectrochim. Acta B 56 (2001) 2219-2228.
171. M. L. Carvalho, P. J. Custodio, U. Reus, Prange, Elemental analysis of human amniotic fluid and placenta by total-reflection X-ray fluorescence and energy-dispersive X-ray fluorescence: child weight and maternal age dependence, Spectrochim. Acta B 56 (2001) 2175-2180.
172. L. M. M. Parra, E. A. Hernandez-Caraballo, Direct analysis of biological samples by total reflection X-ray fluorescence, Spectrochim. Acta B 59 (2004) 1077-1090.
173. B. Ostachowicz, M. Lankosz, B. Tomik, D. Adamek, P. Wobrauschek, C. Strel, P. Kregsamer, Analysis of some chosen elements of cerebrospinal fluid and serum in amyotrophic lateral sclerosis patients by total reflection X-ray fluorescence, Spectrochim. Acta B 61 (2006) 1210-1213.
174. M. Xie, A. von Bohlen, R. Klockenkamper, X. Jian, K. Günther, Multielement analysis of Chinese tea (*Camellia sinensis*) by total-reflection X-ray fluorescence, Z. Lebensm. Unters. For. 207 (1998) 31-38.
175. G. Zaray, A. Varga, F. Fodor, E. Cseh, Microanalytical investigation of xylem sap of cucumber by total reflection X-ray fluorescence spectrometry, Microchem. J. 55 (1997) 64-71.

176. M. Gonzalez, L. Tapia, M. Alvarado, J. d. Tornero, R. Fernandez, Intracellular determination of elements in mammalian cultured cells by total reflection X-ray fluorescence spectrometry, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 14 (1999) 885-888.
177. M. Arredondo, V. Cambiazo, L. Tapia, M. Gonzalez-Aguero, M. T. Nunez, R. Uauy, M. Gonzalez, Copper overload affects copper and iron metabolism in Hep-G2 cells, *Am J. Physiol.-Gastr. L.* 287 (2004) G27-G32.
178. N. Szoboszlai, A. Réti, B. Budai, Z. Szabó, J. Kralovánszky, G. Záray, Direct elemental analysis of cancer cell lines by total reflection X-ray fluorescence, *Spectrochim. Acta B* 63 (2008) 1480-1484.
179. Z. Polgári, F. Meirer, S. Sasamori, D. Ingerle, G. Pepponi, C. Streli, K. Rickers, A. Réti, B. Budai, N. Szoboszlai, G. Záray, Iron speciation in human cancer cells by K-edge total reflection X-ray fluorescence – X-ray absorption near edge structure analysis, *Spectrochim. Acta B* 66 (2011) 274-279.
180. A. Wagner, J. Boman, Biomonitoring of trace elements in muscle and liver tissue of freshwater fish, *Spectrochim. Acta B* 58 (2003) 2215-2226.
181. R. F. B. Serpa, E. F. O. Jesus, M. J. Anjos, M. G. T. do Carmo, S. Moreira, M. S. Rocha, A. M. B. Martinez, R. T. Lopes, Elemental concentration analysis in brain structures from young, adult and old Wistar rats by total reflection X-ray fluorescence with synchrotron radiation, *Spectrochim. Acta B* 61 (2006) 1205-1209.
182. F. R. Espinoza-Quinones, A. N. Modenes, S. M. Palacio, N. Szymanski, R. A. Welter, M. A. Rizzutto, C. E. Borba, A. D. Kroumov, Evaluation of trace element levels in muscles, liver and gonad of fish species from Sao Francisco River of the Parana Brazilian state by using SR-TXRF technique, *Appl. Radiat. Isotopes* 68 (2010) 2202-2207.
183. B. Markert, U. Reus, U. Herpin, The application of TXRF in instrumental multielement analysis of plants, demonstrated with species of moss, *Sci. Total Environ.* 152 (1994) 213-220.
184. A. Varga, R. M. G. Martinez, G. Zaray, F. Fodor, Investigation of effects of cadmium, lead, nickel and vanadium contamination on the uptake and transport processes in cucumber plants by TXRF spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 54 (1999) 1455-1462.
185. I. de la Calle, M. Costas, N. Cabaleiro, I. Lavilla, C. Bendicho, Fast method for multielemental analysis of plants and discrimination according to the anatomical part by total reflection X-ray fluorescence spectrometry, *Food Chem.* 138 (2013) 234-241.

186. L. Benninghoff, D. von Czarnowski, E. Denkhäus, K. Lemke, Analysis of human tissues by total reflection X-ray fluorescence. Application of chemometrics for diagnostic cancer recognition, *Spectrochim. Acta B* 52 (1997) 1039-1046.
187. T. Magalhaes, A. von Bohlen, M. L. Carvalho, M. Becker, Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: A comparative study by TXRF and EDXRF, *Spectrochim. Acta B* 61 (2006) 1185-1193.
188. T. Magalhaes, M. L. Carvalho, A. von Bohlen, M. Becker, Study on trace elements behaviour in cancerous and healthy tissues of colon, breast and stomach: Total reflection X-ray fluorescence applications, *Spectrochim. Acta B* 65 (2010) 493-498.
189. M. Knoll, Aufladepotential und Sekundaremission elektronbestrahlter Körper, *Z. Tech. Phys.* 16 (1935) 467-475.
190. K. Havancsák, J. Lendvai, Nagyfelbontású pásztázó elektronmikroszkóp az Eötvös egyetemen, *Fizikai szemle* 10 (2011) 339-343.
191. A. Bogner, P.-H. Jouneau, G. Thollet, D. Basset, C. Gauthier, A history of scanning electron microscopy developments: Towards “wet-STEM” imaging, *Micron* 38 (2007) 390-401.
192. A. R. Chourasia, D. R. Chopra, Auger Electron Spectroscopy, in: F. A. Settle (Ed.), *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, 1997, pp. 791-808.
193. R. Castaing, Application of electron probes to local chemical and crystallographic analysis, PhD Thesis, University of Paris, Paris, 1951.
194. R. Ortega, Chemical elements distribution in cells, *Nucl. Instrum. Methods* 231 (2005) 218-223.
195. L. W. Swanson, Liquid metal sources: mechanism and applications, *Nucl. Instrum. Methods* 218 (1983) 347-353.
196. C. A. Volkert, A. M. Minor, Focused ion beam microscopy and micromachining, *MRS Bull.* 32 (2007) 389-399.
197. R. M. Langford, P. M. Nellen, J. Gierak, Y. Fu, Focused ion beam micro- and nanoengineering, *MRS Bull.* 32 (2007) 417-423.
198. J. Mayer, L. A. Giannuzzi, T. Kamino, J. Michael, TEM sample preparation and FIB-induced damage, *MRS Bull.* 32 (2007) 400-407.
199. J. Fujita, M. Ishida, T. Ichihashi, Y. Ochiai, T. Kaito, S. Matsui, Growth of three-dimensional nano-structures using FIB-CVD and its mechanical properties, *Nucl. Instrum. Methods* 206 (2003) 472-477.

200. A. K. Pathan, J. Bond, R. E. Gaskin, Sample preparation for scanning electron microscopy of plant surfaces – Horses for courses, *Micron* 39 (2008) 1049-1061.
201. A. G. Valdecasas, A. I. Camacho, On the environmental scanning electron microscope for taxonomic purposes, *Invertebr. Biol.* 124 (2005) 66-73.
202. N. D. Read, C. E. Jeffree, Low-temperature scanning electron microscopy in biology, *J. Microsc.* 161 (1991) 59-72.
203. T. F. Anderson, Techniques for the preservation of three dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope, *T. New York Acad. Sci.* 13 (1951) 130-134.
204. A. Boyde, V. C. Barber, Freeze-drying methods for the scanning electron-microscopical study of the protozoon *Spirostomum ambiguum* and the statocyst of the cephalopod mollusc *Loligo vulgaris*, *J. Cell Sci* 4 (1969) 223-239.
205. W. M. Hess, Fixation and staining of fungus hyphae and host plant root tissues for electron microscopy, *Stain Technol.* 41 (1966) 27-35.
206. K. Tanaka, High resolution electron microscopy of the cell, *Biol. Cell* 65 (1989) 89-98.
207. A. Friedmann, A. Hoess, A. Cismak, A. Heilmann, Investigation of cell-substrate interactions by focused ion beam preparation and scanning electron microscopy, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2499-2507.
208. K. Scott, 3D elemental and structural analysis of biological specimens using electrons and ions, *J. Microscop.* 7 (2011) 2499-2507.
209. K. E. Smart, M. R. Kilburn, C. J. Salter, J. A. C. Smith, C. R. M. Grovenor, NanoSIMS and EPMA analysis of nickel localisation in leaves of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*, *Int. J. Mass Spectrom.* 260 (2007) 107-114.
210. A. Franco, L. Rufo, V. de la Fuente, Metal concentration and distribution in plant tissues of *Nerium oleander* (Apocynaceae, Plantae) from extremely acidic and less extremely acidic water courses in the Rio Tinto area (Huelva, Spain) *Ecol. Eng.* 47 (2012) 87-91.
211. L. Arru, S. Rognoni, M. Baroncini, P. M. Bonatti, P. Perata, Copper localization in *Cannabis sativa* L. grown in a copper-rich solution, *Euphytica* 140 (2004) 33-38.
212. D. Bassi, F. Cappa, P. S. Cocconcelli, A combination of a SEM technique and X-ray microanalysis for studying the spore germination process of *Clostridium tyrobutyricum*, *Res. Microbiol.* 160 (2009) 322-329.
213. S. N. Al-Bahry, I. Y. Mahmoud, I. S. Al-Amari, T. A. Ba-Omar, K. O. Melgheit, A. Y. Al-Kindi, Ultrastructural features and elemental distribution in eggshell during pre and post hatching periods in the green turtle, *Chelonia mydas* at Ras Al-Hadd, Oman, *Tissue Cell* 41 (2009) 214-221.



214. B. Farre, A. Brunelle, O. Laprevote, J.-P. Cuif, C. T. Williams, Y. Dauphin, Shell layers of the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*: Matching microstructure and composition, *Comp. Biochem. Phys. B* 159 (2011) 131-139.
215. A. J. Morgan, P. Kille, A. Bennett, M. O'Reilly, P. Fisher, J. M. Charnock, Pb and Zn imaging and *in situ* speciation at the geogenic/biogenic interface in sentinel earthworms using electron microprobe and synchrotron micro-focus X-ray spectrometry, *Environ. Pollut.* 173 (2013) 68-74.
216. L. Molnar, P. Engelmann, I. Somogyi, L. L. Macsik, E. Pollak, Cold-stress induced formation of calcium and phosphorus rich chloragocyte granules (chloragosomes) in the earthworm *Eisenia fetida*, *Comp. Biochem. Phys. A* 163 (2012) 199-209.
217. M. Aranyosiova, M. Michalka, M. Kopani, B. Rychly, J. Jakubovsky, D. Velic, Microscopy and chemical imaging of Behcet brain tissue, *Appl. Surf. Sci.* 255 (2008) 1584-1587.
218. J. A. Mauritz, R. Seear, A. Esposito, C. F. Kaminski, J. N. Skepper, A. Warley, V. L. Lew, T. Tiffert, X-ray microanalysis investigation of the changes in Na,K, and hemoglobin concentration in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells, *Biophys. J.* 100 (2011) 1438-1445.
219. G. Vankó, A. Vértés, Szinkrotronsugárzás a kémiai szerkezetkutatásban, *Magyar Tudomány* 12 (2002) 1624-1635.
220. M. Stampanoni, A. Groso, A. Isenegger, G. Mikuljan, Q. Chen, A. Bertrand, S. Henein, R. Betemps, U. Frommherz, P. Bohler, D. Meister, M. Lange, R. Abela, Trends in synchrotron-based tomographic imaging: the SLS experience, *Proc. of SPIE* 6318 (2006) 1-14.
221. V. Srajer, T. Teng, T. Ursby, C. Pradervand, Z. Ren, S. Adachi, W. Schildkamp, D. Bourgeois, M. Wulff, K. Moffat, Photolysis of the carbon monoxide complex of myoglobin: nanosecond time-resolved crystallography, *Science* 274 (1996) 1726-1729.
222. R. Verbeni, T. Pylkkanen, S. Huotari, L. Simonelli, G. Vankó, K. Martel, C. Henriquet, G. Monaco, Multiple-element spectrometer for non-resonant inelastic X-ray spectroscopy of electronic excitations, *J. Synchrotron Radiat.* 16 (2009) 469-476.
223. D. V. Rao, M. Swapna, R. Cesareo, A. Brunetti, T. Akatsuka, T. Yuasa, T. Takeda, G. Tromba, G. E. Gigante, Investigation of the distribution of elements in snail shell with the use of synchrotron-based, micro-beam X-ray fluorescence spectrometry, *J. Trace Elem. Med. Bio.* 23 (2009) 251-257.

224. P. Bleuet, L. Lemelle, R. Tucoulou, P. Gergaud, G. Delette, P. Cloetens, J. Susini, A. Simionovici, 3D chemical imaging based on a third-generation synchrotron source, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 518-527.
225. E. A. Stern, D. E. Sayers, Extended X-ray-absorption fine-structure technique. III. Determination of physical parameters, *Phys. Rev. B* 11 (1975) 4836-4846.
226. P. D'Angelo, Combined XANES and EXAFS analysis of  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  aqueous solutions, *Phys. Rev. B* 66 (2002) 064209.
227. M. Benfatto, P. D'Angelo, S. D. Longa, N. V. Pavel, Evidence of distorted fivefold coordination of the  $\text{Cu}^{2+}$  aqua ion from an X-ray-absorption spectroscopy quantitative analysis, *Phys. Rev. B* 65 (2002) 174205.
228. Y. Zhao, J. G. Parsons, J. R. Peralta-Videa, M. L. Lopez-Moreno, J. L. Gardea-Torresday, Use of synchrotron- and plasma-based spectroscopic techniques to determine the uptake and biotransformation of chromium(III) and chromium(VI) by *Parkinsonia aculeata*, *Metallomics* 1 (2009) 330-338.
229. P. Merdy, E. Guillon, J. Dumonceau, M. Aplincourt, Spectroscopic study of copper(II) – wheat straw cell wall residue surface complexes, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1728-1733.
230. G. Nuyts, S. Cagno, K. Hellemans, G. Veronesi, M. Cotte, K. Janssens, Study of the early stage of Mn intrusion in corroded glass by means of combined SR FTIR/ $\mu$ XRF imaging and XANES spectroscopy, *Procedia Chemistry* 8 (2013) 239-247.
231. H. Oyanagi, T. Matsushita, H. Tanoue, T. Ishiguro, K. Kohra, Fluorescence-detected X-ray absorption spectroscopy applied to structural characterization of very thin films; ion-beam-induced modification of thin Ni layers on Si(100), *Jpn. J. Appl. Phys.* 24 (1985) 610-619.
232. J. Chan, M. E. Merrifield, A. V. Soldatov, M. J. Stillman, XAFS spectral analysis of the cadmium coordination geometry in cadmium thiolate clusters in metallothionein, *Inorg. Chem.* 44 (2005) 4923-4923.
233. E. Montarges-Pelletier, V. Chardot, G. Echevarria, L. J. Michot, A. Bauer, J.-L. Morel, Identification of nickel chelators in three hyperaccumulating plants: An X-ray spectroscopic study, *Phytochemistry* 69 (2008) 1695-1709.
234. E. Strub, R. Plarre, M. Radtke, U. Reinholz, H. Riesemeier, U. Schoknecht, K. Urban, P. Jungel, Determination of Cr(VI) in wood specimen: A XANES study at the Cr K edge, *Nucl. Instrum. Meth. B* 266 (2008) 2405-2407.

235. M. L. Lopez-Moreno, G. De La Rosa, J. A. Hernandez-Viezcas, H. Castillo-Michel, C. E. Botez, J. R. Peralta-Videa, J. L. Gardea-Torresdey, Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO<sub>2</sub> nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 7315-7320.
236. M. Lei, X.-M. Wan, Z.-C. Huang, T.-B. Chen, X.-W. Li, Y.-R. Liu, First evidence on different transportation modes of arsenic and phosphorus in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*, *Environ. Pollut.* 161 (2012) 1-7.
237. X. Zhou, L. Wang, X. Sun, X. Yang, C. Chen, Q. Wang, X. Yang, Cinnabar is not converted into methylmercury by human intestinal bacteria, *J. Ethnopharmacol.* 135 (2011) 110-115.
238. J. Chwiej, D. Adamek, M. Szczerbowska-Boruchowska, A. Krygowska-Wajs, S. Bohic, M. Lankosz, Study of Cu chemical state inside single neurons from Parkinson's disease and control substantia nigra using the micro-XANES technique, *J. Trace Elem. Med. Bio.* 22 (2008) 183-188.
239. S. Misra, D. Peak, N. Chen, C. Hamilton, S. Niyogi, Tissue-specific accumulation and speciation of selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to elevated dietary selenomethionine, *Comp. Biochem. Phys. C* 155 (2012) 560-565.
240. M. Cusack, Y. Dauphin, J.-P. Cuif, M. Salome, A. Freer, H. Yin, Micro-XANES mapping of sulphur and its association with magnesium and phosphorus in the shell of the brachiopod, *Terebratulina retusa*, *Chem. Geol.* 253 (2008) 172-179.
241. M. Palikova, V. Barus, Mercury content in *Anguillicola crassus* (Nematode) and its host *Anguilla anguilla*, *Acta Vet. Brno* 72 (2003) 289-294.
242. R. Azmat, S. Fayyaz, N. Kazi, S. J. Mahmood, F. Uddin, Natural bioremediation of heavy metals through nematode parasite of fish, *Biotechnology* 7 (2008) 139-143.
243. I. L. Davydova, N. P. Fadeeva, L. T. Kovekovdova, V. I. Fadeev, Heavy metal contents in tissues of dominant species of the benthos and in bottom sediments of Zolotoi Rog Bay, Sea of Japan, *Ecology* 31 (2005) 176-180.
244. Y.-T. Lin, H. Hoang, S. I. Hsieh, N. Rangel, A. L. Foster, J. N. Sampayo, G. J. Lithgow, C. Srinivasan, Manganese ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a short – lived *Caenorhabditis elegans* mutant, *Free Radical. Bio. Med.* 40 (2006) 1185-1193.
245. K. J. Helmcke, T. Syversen, D. M. Miller, M. Aschner, Characterization of the effects of methylmercury on *Caenorhabditis elegans*, *Toxicol. Appl. Pharm.* 240 (2009) 265-272.

246. J. Kim, T. Shrisawa, Y. Miyamoto, The effect of TAT conjugated platinum nanoparticles on lifespan in a nematode *Caenorhabditis elegans* model, *Biomaterials* 31 (2010) 5849-5854.
247. W.-H. Li, F.-L. Hsu, J.-T. Liu, V. H.-C. Liao, The ameliorative and toxic effects of selenite on *Caenorhabditis elegans*, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 812-819.
248. S. W. Caito, Y. Zhang, M. Aschner, Involvement of AAT transporters in methylmercury toxicity in *Caenorhabditis elegans*, *Biochem. Bioph. Res. Co.* 435 (2013) 546-550.
249. M.-K. Yeo, D.-H. Nam, Influence of different types of nanomaterials on their bioaccumulation in a paddy microcosm: A comparison of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and nanotubes, *Environ. Pollut.* 178 (2013) 166-172.
250. R. Howell, Levels of heavy metal pollutants in two species of marine nematodes, *Mar. Pollut. Bull.* 13 (1982) 396-398.
251. R. Howell, Heavy metals in marine nematodes: uptake, tissue distribution and loss of copper and zinc, *Mar. Pollut. Bull.* 14 (1983) 263-268.
252. R. Howell, The secretion of mucus by marine nematodes (*Enoplus* spp.): A possible mechanism influencing the uptake and loss of heavy metal pollutants, *Nematologica* 28 (1982) 110-114.
253. W. L. Nicholas, D. J Goodchild, A. Stewart, The mineral composition of intracellular inclusions in nematodes from thiobiotic mangrove mud-flats, *Nematologica* 33 (1987) 167-179.
254. C. G. Cranfield, A. Dawe, V. Karloukovski, R. E. Dunin-Borkowski, D. de Pomerai, J. Dobson, Biogenic magnetite in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *P. R. Soc. B* 271 (2004) S436-S439.
255. M. S. R. Williams, S. Seraphin, Heavy metal biomineralization in free-living nematodes, *Panagrolaimus* spp., *Mater. Sci. Eng. C* 6 (1998) 47-51.
256. B. P. Jackson, P. L. Williams, A. Lanzirotti, P. M. Bertsch, Evidence for biogenic pyromorphite formation by the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5620-565.
257. Y. Gao, N. Liu, C. Chen, Y. Luo, Y. Li, Z. Zhang, Y. Zhao, B. Zhao, A. Iida, Z. Chai, Mapping technique for biodistribution of elements in a model organism, *Caenorhabditis elegans*, after exposure to copper nanoparticles with microbeam synchrotron radiation X-ray fluorescence, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 23 (2008) 1121-1124.
258. S. A. James, M. D. de Jonge, D. L. Howard, A. I. Bush, D. Paterson, G. McColl, Direct *in vivo* imaging of essential bioinorganics in *Caenorhabditis elegans*, *Metallomics* 5 (2013) 627-635.

259. G. McColl, S. A. James, S. Mayo, D. L. Howard, C. G. Ryan, R. Kirkham, G. F. Moorhead, D. Paterson, M. D. de Jonge, A. I. Bush, *Caenorhabditis elegans* maintains highly compartmentalized cellular distribution of metals and steep concentration gradients of manganese, *Plos One* 7 (2012) e32685.
260. R. D. Leapman, E. Kocsis, G. Zhang, T. L. Talbot, P. Laquerriere, Three-dimensional distribution of elements in biological samples by energy-filtered electron tomography, *Ultramicroscopy* 100 (2004) 115-125.
261. R. Howell, L. Smith, Flux of cadmium through the marine nematode *Enoplus brevis* Bastian, 1865, *Revue Nematol.* 8 (1985) 45-51.
262. S. Zeitoun-Ghandour, J. M. Charnock, M. E. Hodson, O. I. Leszczyszyn, C. A. Blindauer, S. R. Sturzenbaum, The two *Caenorhabditis elegans* metallothioneins (CeMT-1 and CeMT-2) discriminate between essential zinc and toxic cadmium, *FEBS J.* 277 (2010) 2531-2542.
263. Y. Qu, W. Li, Y. Zhou, X. Liu, L. Zhang, L. Wang, Y.-F. Li, A. Iida, Z. Tang, Y. Zhao, Z. Chai, C. Chen, Full assessment of fate and physiological behavior of quantum dots utilizing *Caenorhabditis elegans* as a model organism, *Nano Lett.* 11 (2011) 3174-3183.
264. D. J. F. Brown, B. Boag, An examination of methods used to extract virus-vector nematodes (Nematoda: Longidoridae and Trichodoridae) from soil samples, *Nematol. Medit.* 16 (1988) 93-99.
265. H. Riesemeier, K. Ecker, W. Gorner, B. R. Muller, M. Radtke, M. Krumrey, Layout and first XRF application of the BAMline at BESSY II, *X-ray Spectrom.* 34 (2005) 160-163.
266. A. Erko, I. Zizak, Hard X-ray micro-spectroscopy at Berliner Elektronspeicherring für Synchrotronstrahlung II, *Spectrochim. Acta B* 64 (2009) 833-848.
267. M. Newville, IFEFFIT: interactive XAFS analysis and FEFF fitting, *J. Synchrotron Radiat.* 8 (2001) 322-324.
268. H. Ferris, R. C. Venette, S. S. Lau, Population energetics of bacterial-feeding nematodes: carbon and nitrogen budgets, *Soil Biol. Biochem.* 31 (1999) 1265-1279.
269. W. G. Wadsworth, D. L. Riddle, Acidic intracellular pH shift during *Caenorhabditis elegans* larval development, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8435-8438.
270. K. Sagheb-Talebi, B. D. Abazari, M. Namiranian, Regeneration process in natural uneven-aged Caspian beech forests of Iran, *Schweiz. Z. Forstwes.* 156 (2005) 477-480.
271. M. Lopez-Alonso, F. Prieto, M. Miranda, C. Castillo, J. Hernandez, J. L. Bedito, The role of metallothionein and zinc in hepatic copper accumulation in cattle, *Vet. J.* 169 (2005) 262-267.

272. M. Bernal, R. Cases, R. Picorel, I. Yruela, Foliar and root Cu supply affect differently Fe- and Zn-uptake and photosynthetic activity in soybean plants, *Environ. Exp. Bot.* 60 (2007) 145-150.
273. S. E. Smith, E. J. Larson, Zinc toxicity in rats. Antagonistic effects of copper and liver, *J. Biol. Chem.* 60 (2007) 145-150.
274. L. Hao, L. Chen, J. Hao, N. Zhong, Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc oxide nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): A comparative study with its bulk counterparts, *Ecotox. Environ. Safe.* 91 (2013) 52-60.
275. M. K. Chettri, T. Sawidis, G. A. Zachariadis, J. A. Stratis, Uptake of heavy metals by living and dead *Cladonia* thalli, *Environ. Exp. Bot.* 37 (1997) 39-52.
276. T. Srinath, T. Verma, P. W. Ramteke, S. K. Garg, Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria, *Chemosphere* 48 (2002) 427-435.
277. C. T. Dillon, P. A. Lay, B. J. Kennedy, A. P. J. Stampfl, Z. Cai, P. Ilinski, W. Rodrigues, D. G. Legnini, B. Lai, J. Maser, Hard X-ray microprobe studies of chromium(VI)-treated V79 Chinese hamster lung cells: intracellular mapping of the biotransformation products of a chromium carcinogen, *J. Biol. Inorg. Chem.* 7 (2002) 640-645.
278. J. Messer, M. Reynolds, L. Stoddard, A. Zhitkovich, Causes of DNA single-strand breaks during reduction of chromate by glutathione in vitro and in cells, *Free Radical Bio. Med.* 40 (2006) 1981-1992.
279. L. Dupont, E. Guillon, J. Bouanda, J. Dumonceau, M. Aplincourt, EXAFS and XANES studies of retention of copper and lead by lignocellulosic biomaterial, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 5062-5066.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Záray Gyulának, témavezetőmnek, az Eötvös Loránd Tudományegyetem Analitikai Kémiai Tanszék egyetemi tanárának, munkám háttérének folyamatos biztosításáért. Köszönet illeti őt a doktori éveim alatt adott tanácsaiért. Külön szeretném még kiemelni Prof. Christina Strelit, a Technische Universität Wien Atominstitut munkatársát, aki lehetővé tette számomra intézetében a TXRF méréseket, valamint nagy segítségemre volt a szinkrotronos mérések megszervezésében, lebonyolításában, az eredmények közzétételében.

Köszönöm Dr. Nagy Péter Istvánnak, Hrács Krisztinának és Horváth Boglárkának, a Szent István Egyetem Állattani és Állatökológiai Tanszék egyetemi docensének és doktoranduszainak a mintavételt, illetve a közös mintaelőkészítési munkák során nyújtott segítségüket, a vidám hangulatot. Köszönettel tartozom Bernhard Pemmernek, a TU-Wien Atominstitut munkatársának a TXRF mérések során nyújtott segítségéért. Hálás vagyok Dr. Giancarlo Pepponinak, a Fondazione Bruno Kessler MiNALab, valamint Günter Buzanichnak a Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung munkatársainak a szinkrotronos mérések során nyújtott szakértő segítségükért. Köszönöm Dr. Dankházi Zoltán és Dr. Havancsák Károly egyetemi docenseknek, valamint Horváth Gábor tudományos segédmunkatársnak, az ELTE Anyagfizikai Tanszék dolgozóinak, a SEM laboratórium munkatársainak az elektronmikroszkópos méréseim során nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom kutatócsoportunk doktoranduszainak – egyiküket sem emelve ki külön – a doktori éveim során nyújtott segítségükért, támogatásukért és a jó hangulatú munkanapokért.

Köszönetemet fejezem ki az anyagi segítségért a következőknek: OTKA (K 81401), TÁMOP (4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0003, 4.2.2/B-10/1-2010-0030 és 4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003), FP7 keretprogram (226716).

## **Az értekezés témájában megjelent tudományos közlemények**

1. Z. Sávoly, P. Nagy, K. Havancsák, G. Záray, Microanalytical Investigation of Nematodes, *Microchem. J.* 105 (2012) 83-87. DOI: 10.1016/j.microc.2012.03.021, IF=3,05.
2. Z. Sávoly, G. Pepponi, P. Nagy, C. Streli, G. Buzanich, E. Chinea-Cano, G. Záray, Investigation of distribution and oxidation state of copper in soil-inhabiting nematodes by means of synchrotron radiation, *X-Ray Spectrom.* 42 (2013) 321-329. DOI: 10.1002/xrs.2481, IF=1,45.
3. Z. Sávoly, P. Nagy, G. Varga, K. Havancsák, K. Hrács, G. Záray, A novel method for investigation of uptake and distribution of polluting microelements and nanoparticles in soil-inhabiting nematodes, *Microchem. J.* 110 (2013) 558-567. DOI: 10.1016/j.microc.2013.07.007, IF=3,05.

## **Szóbeli előadások az értekezés témájában**

1. Z. Sávoly, G. Záray, P. Nagy, Mikroelemek növényi kártevő fonálférgekre gyakorolt hatásának vizsgálata, *Növényvédelmi Tudományos Napok*, Budapest, 2011.
2. Z. Sávoly, Z. Polgári, A. Réti, C. Streli, P. Kregsamer, N. Szoboszlai, P. Nagy, G. Záray, Microanalysis of biological materials by X-ray and plasma-based techniques, *XXXVII Colloquium Spectroscopicum Internationale*, Buzios (Brazília), 2011.
3. Z. Sávoly, G. Záray, P. Nagy, Development of X-ray spectrometric methods for chemical characterization of nematodes, *XIV Hungarian-Italian Symposium on Spectrochemistry*, Sümeg, 2011.
4. P. Nagy, Z. Sávoly, N. Mátrai, B. Horváth, G. Záray, G. Bakonyi, Nem szokványos ökotoxikológiai vizsgálatok fonálférgekkel, *TOX'2011 Tudományos Konferencia*, Sümeg, 2011.
5. P. Nagy, Z. Sávoly, K. Hrács, B. Horváth, G. Záray, Eltérő krómformák toxicitásának és felvételi viszonyainak vizsgálata talajlakó fonálférgeken, *II. Ökotoxikológiai Konferencia*, Budapest, 2012.
6. Z. Sávoly, K. Hrács, K. Havancsák, P. Nagy, G. Záray, Talajlakó fonálférgek mikroanalitikai vizsgálata FIB-SEM technika segítségével, *II. Ökotoxikológiai Konferencia*, Budapest, 2012.



7. P. Nagy, Z. Sávolgy, K. Hrács, B. Horváth, G. Záray, G. Bakonyi, Szabadon élő fonálférgek bioindikációs alkalmazási lehetőségei – felvételi viszonyok vizsgálata, TOX'2012 Tudományos Konferencia, Hévíz, 2012.
8. P. Nagy, Z. Sávolgy, K. Hrács, B. Horváth, G. Záray, Studies on the copper uptake by the plant-feeding nematode, *Xiphinema vuittenezi*, 2nd International Symposium on Nematodes as Environmental Bioindicators, Ghent (Belgium), 2012.
9. P. Nagy, Z. Sávolgy, K. Havancsák, K. Hrács, B. Horváth, G. Záray, Heavy metal effects on nematodes: stress responses and uptake characteristics of *Xiphinema vuittenezi*, 31st International Symposium of the European Society of Nematologists, Adana (Törökország), 2012.
10. Z. Sávolgy, P. Nagy, G. Záray, Talajszennyező elemek fonálférgekre gyakorolt hatásának vizsgálata röntgen spektrometriával, 55. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Veszprém, 2012.
11. Z. Sávolgy, G. Pepponi, P. Nagy, C. Strelly, G. Buzanich, G. Záray, Investigation of copper uptake of soil-inhabiting nematodes by means of synchrotron radiation, Bécs (Ausztria), 2012.
12. Z. Sávolgy, P. Nagy, G. Záray, Talajszennyezés hatásának mikroanalitikai vizsgálata fonálférgekben, 56. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Veszprém, 2013.

## **Poszter az értekezés témájában**

1. Z. Sávolgy, P. Nagy, G. Záray, Studies on the elemental uptake of the plant-feeding nematode *Xiphinema vuittenezi*, 30th International Symposium of the European Society of Nematologists, Bécs (Ausztria), 2013.

## **Egyéb szóbeli előadás**

1. Z. Sávolgy, P. Dobosy, K. Barkács, A. Erőss, E. Kuzmann, Z. Homonnay, J. Mádl-Szőnyi, G. Záray, Chemical characterization of biofilms formed in hypogene spring caves of Budapest, International Symposium on Hierarchical Flow Systems in Karst Regions, Budapest, 2013.